



UNIVERSITÉ DE
SHERBROOKE

Faculté de génie
Département de génie électrique et de génie informatique

CONCEPTION D'UN SYSTÈME DE BIODÉTECTION À BASE DE
RÉSONANCE DES PLASMONS DE SURFACE APPLIQUÉ À LA MESURE
D'ACTIVITÉ CELLULAIRE

Mémoire de maîtrise es sciences appliquées
Spécialité : génie électrique

Composition du jury :
Paul Charette
Jacques Beauvais
Vincent Aimez
Jean-Pierre Cloarec, professeur invité

VINCENT CHABOT

Sherbrooke (Québec), Canada

Mai 2008

TV-1871



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-42942-6

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-42942-6

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

RÉSUMÉ

Ce document présente les notions de base permettant la conception d'un système de biodétection reposant sur la résonance des plasmons de surface. Il expose ensuite les grandes étapes de la conception du système, sa caractérisation, de même que son application à la mesure de l'activité cellulaire.

Plus particulièrement, un système de biodétection basé sur la résonance des plasmons de surface a été conçu et réalisé. Ce système, intégrant deux types de détection, soit la modulation de l'angle de couplage aux plasmons de surface ainsi que la modulation de l'intensité d'un laser réfléchi sur le substrat, a été fabriqué sous la forme d'un goniomètre vertical. Un prisme sur lequel était déposé le substrat assurait le couplage de ce dernier avec un laser, permettant la mesure de la résonance des plasmons de surface. Ce système a été caractérisé quant à sa fidélité, sa sensibilité, sa plage dynamique et sa résolution.

Finalement, le système a été appliqué à la mesure de l'activité de cellules vivantes induite par l'injection d'agents reconnus pour leur effet sur la morphologie des cellules. Cette application démontre qu'un biocapteur à large plage de détection peut être formé par la combinaison de la résonance des plasmons de surface et d'une monocouche de cellules vivantes. Ce biocapteur permet de détecter en temps réel des agents chimiques ou biologiques induisant des changements morphologiques dans la cellule.

Mots-clés : Plasmon de surface, SPR, cellules, biocapteur, biodétection.

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mes directeurs Paul Charette et Jacques Beauvais pour leur support tout au long de mes travaux de maîtrise. Leur encadrement tout au long du projet et leur confiance pour la conception et l'exécution des travaux ont rendu possible la réalisation du projet tel qu'il est désormais. J'aimerais aussi remercier Michel Grandbois pour l'hébergement du système dans son laboratoire, de même que pour sa grande disponibilité.

Ensuite, j'aimerais remercier les étudiants du Laboratoire de Biophotonique et d'Optoélectronique pour les nombreuses discussions sur le montage optique et leur patience face à mes emprunts de matériel. Un remerciement particulier pour Étienne Grondin, professionnel de recherche, pour son aide à la conception du système sur le plan optique. Les étudiants du laboratoire Grandbois ont aussi toute ma gratitude pour leur patience à m'expliquer les rudiments du travail impliquant des cellules vivantes ou me faire comprendre leur domaine d'expertise.

J'aimerais aussi remercier le personnel des salles blanches de l'Université de Sherbrooke, notamment Mélanie Cloutier, Abdelatif Jaouad, Caroline Roy et Guillaume Bertrand, pour la fabrication des substrats. Ensuite, le personnel du Département de Physique, principalement Michael Lacerte et Frédérick Francoeur, pour l'aide à la conception mécanique et pour la fabrication de pièces.

Je remercie particulièrement les utilisateurs du système, qui ont grandement contribué à son amélioration continue : Raymond Jr Hamel, Ewa Wiczerzak, Charles Cuerrier et Sylvain Vigneux.

J'aimerais terminer en remerciant les gens qui m'ont encouragé et soutenu tout au long du périple : mes parents, ma soeur et Nathalie. Votre support et votre confiance ont grandement facilité ma tâche.

TABLE DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION	1
1.1	Mise en contexte	1
1.2	Objectifs de l'étude	3
1.3	Méthodologie	3
1.4	Élaboration des spécifications	4
1.4.1	Sensibilité	4
1.4.2	Flexibilité	4
1.4.3	Substrats	5
1.4.4	Fluidique	5
1.4.5	Utilisation	5
2	THÉORIE	6
2.1	Plasmon de surface: définition	6
2.2	Les techniques de couplage aux plasmons de surface	8
2.2.1	Le couplage par réflexion totale interne au sein d'un prisme	8
2.2.2	Le couplage à l'aide d'un réseau de diffraction	10
2.3	La SPR pour l'étude de réactions moléculaires	11
2.4	La sélection du métal	12
2.5	Les alternatives de détection	13
2.5.1	L'évaluation de l'angle de couplage	13
2.5.2	L'évaluation de la longueur d'onde de couplage	14
2.5.3	L'évaluation de la puissance à angle fixé	15
2.5.4	L'évaluation de la différence de phase	16
2.6	Les méthodes de traitement des résultats	17
2.6.1	La normalisation de la réflectance	17
2.6.2	Le traitement par méthode centroïde	18
2.6.3	L'analyse par modélisation polynomiale	19
2.6.4	L'algorithme de ligne de base dynamique	19
2.6.5	L'analyse par modélisation paramétrique	20
3	CONCEPTION ET CARACTÉRISATION DU SYSTÈME SPR	21
3.1	La conception du système	21
3.1.1	La sélection de la méthode de détection	21
3.1.2	La fabrication du goniomètre	22
3.1.3	La fabrication des substrats	23
3.1.4	La cellule fluidique	25
3.1.5	La normalisation de la réponse	26
3.1.6	L'optimisation de la détection	27
3.1.7	L'installation du système	29
3.2	Logiciels de contrôle et d'analyse	30
3.2.1	Le logiciel de contrôle	30
3.2.2	La calibration automatique de la plate-forme	31
3.2.3	L'algorithme d'analyse	32
3.3	La caractérisation du système	33
3.3.1	Fidélité des mesures	33
3.3.2	Sensibilité du système	33
3.3.3	Plage dynamique	36
3.3.4	Résolution	37
3.3.5	Résumé des caractéristiques techniques	38
3.3.6	Caractérisation d'une réaction biomoléculaire	38
3.3.7	Caractérisation de l'origine de la réponse SPR de cellules vivantes	41

4	MESURE D'ACTIVITÉ CELLULAIRE PAR RÉSONANCE DES PLASMONS DE	
	SURFACE	42
	CONCLUSION.....	57
	APPENDICE 1 – ANALYSE MATHÉMATIQUE DE CINÉTIQUES	61

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : Atténuation spatiale du champ évanescent des plasmons de surface.....	6
Figure 2.2 : Dispersion des plasmons de surface sur un métal et des photons dans un diélectrique	7
Figure 2.3 : Couplage plasmonique par la réflexion totale atténuée dans un prisme.....	8
Figure 2.4 : Dispersion du vecteur d'onde des plasmons et des photons pour la réflexion totale atténuée.....	9
Figure 2.5 : Variation de l'angle de couplage aux plasmons de surface due au changement de permittivité du diélectrique.....	10
Figure 2.6 : Couplage plasmonique à l'aide d'un réseau de diffraction.....	11
Figure 2.7 : Schéma représentant l'adhésion moléculaire affectant l'angle de résonance SPR	12
Figure 2.8 : Configurations usuelles pour une interrogation angulaire couplée par prisme.....	13
Figure 2.9 : Suivi de la puissance en fonction du temps pour une variation d'indice de réfraction.....	15
Figure 2.10 : Différence de phase entre les polarisations TM et TE pour une variation d'indice de réfraction donnée	16
Figure 2.11 : Normalisation des données à l'aide de la polarisation TE pour une interrogation spectrale	18
Figure 2.12 : Comparaison entre la méthode centroïde (a) et la modélisation polynomiale (b)	19
Figure 2.13 : Exemple d'application de la ligne de base dynamique	20
Figure 3.1 : Représentation du dessus et représentation isométrique du système SPR.....	23
Figure 3.2 : Comparaison par simulation et par expérimentation des résultats SPR pour des substrats d'or (a) et d'argent (b)	24
Figure 3.3 : Illustrations de la cellule fluide et de son installation.....	26
Figure 3.4 : Insertion d'un polarisateur rotatif entre le prisme et le photodétecteur pour effectuer la normalisation	27
Figure 3.5 : Réponse SPR typique avec un détecteur 1830-C équipé d'une tête de détection 818-UV de Newport et avec un détecteur DET100A de Thorlabs.....	28
Figure 3.6 : Schéma représentant le montage optique final du système SPR	29
Figure 3.7 : Photos montrant le système SPR (a) et le prisme fixé sur son support (b).....	29
Figure 3.8 : Vue globale du système SPR	30
Figure 3.9 : Interface de contrôle du système SPR.....	31
Figure 3.10 : Exemple de l'application de l'algorithme de ligne de base dynamique appliqué sur un balayage angulaire sur substrat d'or dans l'eau déionisée.....	32
Figure 3.11 : Balayages angulaires sur substrat d'or pour des solutions d'indices de réfraction donnés.....	34
Figure 3.12 : Relation liant l'angle de couplage optimal et l'indice de réfraction du milieu...	35
Figure 3.13 : Relation liant la variation de réflectance à l'indice de réfraction, à l'angle 71°.	36
Figure 3.14 : Schéma réactionnel de la ligation chimique native d'une bradykinine modifiée	39
Figure 3.15 : Vue élargie centrée sur le minimum pour des balayages angulaires effectués après chaque étape pour la réaction NCL	40
Figure 3.16 : Suivi SPR à angle fixe pour différentes concentrations de catalyseur pour la réaction de NCL	41
Figure A1.1 : Comparaison d'une réaction catalysée de ligation chimique native pour une bradykinine modifiée et une bradykinine non modifiée.....	62

Figure A1.2 : Modélisation d'un courbe SPR typique de ligation chimique native catalysée.	63
Figure A1.3 : Compilation des cinétiques de ligation chimique native pour différentes concentrations du catalyseur, obtenues par modélisation.....	64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Résolution théorique des couplages par prisme et réseau en fonction du type d'interrogation, donnée en unités d'indice de réfraction (RIU)	17
Tableau 3.1 : Résumé des spécifications techniques du système conçu et comparaison avec un système commercial	38

LEXIQUE

SPR	Résonance des plasmons de surface
TM	Polarisation transverse magnétique ou polarisation p
TE	Polarisation transverse électrique ou polarisation s
RIU	Unité d'indice de réfraction
RVU	Unité de variation de réflectance, où 1 RVU = 0.1% variation en réflectance
SiO ₂	Silice
NCL	Ligation chimique native
MPAA	Acide 4-mercaptophénylacétique
APTES	Aminopropyltriethoxy Silane

1 INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

Dans plusieurs domaines tels la santé, l'alimentation et l'environnement, on dénote un besoin pour une détection de la présence de certains composants retrouvés en très faible concentration. Pour répondre à ce besoin, la recherche est en effervescence pour élaborer le design de biocapteurs et de capteurs de toxicité. Selon la revue *Biosensors and Bioelectronics*, un biocapteur est défini comme étant « un dispositif analytique incorporant un matériel biologique, un matériel dérivé biologiquement ou une biomimétique intimement associé ou intégré à un transducteur physicochimique ou microsystème de transduction, pouvant être optique, électrochimique, thermométrique, piézoélectrique, magnétique ou micromécanique [*Guide for authors*, 2007] ».

Plusieurs systèmes de détection se livrent compétition pour fournir des dispositifs offrant la résolution des meilleures techniques de laboratoire, tout en étant compacts, simples d'emploi et économiques afin de permettre leur utilisation en clinique, chez le patient ou sur le terrain. Les capteurs employant une détection optique sont parmi les candidats les plus prometteurs. Utilisés de plus en plus couramment en laboratoire, certains sont même disponibles commercialement, en particulier les capteurs par résonance de plasmons de surface (SPR).

Phénomène d'abord découvert en 1902 par Wood comme une anomalie dans un réseau de diffraction [WOOD, 1902], la SPR n'a commencé à être appliquée qu'en 1982 à l'analyse de réactions biomoléculaires. [NYLANDER et coll., 1982, LIEDBERG et coll., 1983, LIEDBERG et coll., 1995]. La SPR est maintenant une technique de laboratoire utilisée couramment et plusieurs plates-formes SPR sont disponibles commercialement, tels les systèmes de Biacore ou le SPREETA de Sensata Technologies, offrant aux chercheurs en chimie et pharmacologie des possibilités de détection et d'analyse de plus en plus sophistiquées.

La SPR est normalement employée dans l'étude des cinétiques de réactions ou pour caractériser des liaisons moléculaires spécifiques, puisqu'elle démontre une bonne sensibilité à mesurer de faibles changements de masse sur la surface du substrat, sans nécessiter l'emploi d'agents de marquage [MULLETT et coll., 2000]. Pour ce faire, la surface du substrat est généralement fonctionnalisée, c'est-à-dire traitée chimiquement ou biologiquement, pour la rendre sensible à un type de molécule spécifique.

Même si elle est principalement utilisée pour l'étude d'interactions biomoléculaires, la SPR a aussi été employée pour étudier des phénomènes physiologiques isolés des systèmes cellulaires, par exemple les interactions entre protéines et membrane cellulaire [BESENICAR et coll., 2006], l'attachement de l'actine et la myosine dans des sarcomères intacts [TONG et coll., 2001] ou la croissance d'une membrane de phospholipides [LIRTSMAN et coll., 2005]. Récemment, la SPR a été appliquée au suivi en temps réel de cellules vivantes afin d'identifier des processus moléculaires [YANASE et coll., 2007, HIDE et coll., 2002]. Elle a aussi été appliquée à la détection de la coagulation sanguine et de l'adhésion des plaquettes sous conditions de débit physiologique [HANSSON et coll., 2007]. Finalement, la SPR infrarouge a aussi permis le suivi de l'enrichissement et de l'appauvrissement du niveau de cholestérol dans le plasma membranaire de cellules vivantes [ZIBLAT et coll., 2006].

Les résultats des études précédentes démontrent donc que l'activité cellulaire peut être reflétée par les mesures de résonance des plasmons de surface. Normalement, l'activité cellulaire est identifiée grâce à la microscopie conventionnelle ou la mesure de l'impédance électrique cellule substrat. Or, ces méthodes démontrent certains désavantages, notamment la difficulté d'identifier une activation cellulaire par microscopie ou la détection invasive pour l'impédance électrique. Outre sa grande sensibilité et sa détection non invasive, un avantage de pouvoir employer la résonance des plasmons de surface pour mesurer l'activité cellulaire est sa simplicité de mise en œuvre.

Il serait donc possible d'utiliser une population de cellules vivantes comme rapporteur et d'évaluer, grâce à la résonance des plasmons de surface, comment ces cellules répondent à leur environnement. L'application ici est donc la combinaison de la résonance des plasmons de surface avec une monocouche de cellules vivantes pour créer un biocapteur permettant la détection d'une multitude de stimuli cellulaires, dans le but de déterminer la toxicité d'un milieu ou la présence de composés actifs.

1.2 Objectifs de l'étude

Dans ce contexte, l'étude suivante aura pour but de :

- 1) Développer un système de détection par résonance de plasmons de surface. Ce dispositif devra être flexible pour permettre des études futures sur différents substrats et pour analyser diverses réactions moléculaires. La conception du système devra en faciliter les modifications futures afin de l'employer comme plate-forme de développement de nouvelles applications.
- 2) Tester le système et le caractériser en terme de linéarité, sensibilité et limite de détection par l'étude de solutions connues.
- 3) Employer le système à la mesure d'activité cellulaire suivant une activation spécifique et valider les réponses obtenues avec les changements de morphologie cellulaire démontrés par la microscopie à contraste de phase.

1.3 Méthodologie

La méthodologie retenue pour effectuer la présente étude sera d'abord de concevoir le système de détection par résonance de plasmons de surface. Des spécifications de conception claires seront élaborées. Sa conception devra être flexible pour permettre de l'employer comme plate-forme de détection, tant pour évaluer l'activité d'une monocouche cellulaire que pour étudier des réactions moléculaires.

Ensuite, le système devra être caractérisé à l'aide de solutions d'indices de réfraction connus. La SPR étant une technique de détection optique reposant sur la mesure des indices de réfraction en surface, cette caractérisation devra permettre de quantifier la sensibilité et la limite de résolution de l'appareil de mesure. L'appareil sera ensuite employé pour caractériser une réaction biomoléculaire, soit l'adhésion d'une bradykinine modifiée sur une cystéine par voie de ligation chimique native catalysée. Cette caractérisation permettra de valider l'appareil pour l'étude de réactions moléculaires.

Des substrats SPR serviront ensuite de support à la croissance d'une monocouche cellulaire et permettront d'étudier en temps réel l'activation de cellules vivantes suite à l'ajout de stimuli de types différents, soit une endotoxine provenant d'une souche bactérienne, un composé chimique toxique ainsi qu'un agoniste physiologique. La réponse obtenue par le système développé sera validée grâce à la microscopie à contraste de phase, permettant ainsi de démontrer que le dispositif conçu permet de mesurer en temps réel l'activité cellulaire.

1.4 Élaboration des spécifications

Le système de détection par résonance des plasmons de surface doit être appliqué à la mesure d'activité cellulaire. Cependant, sa conception doit démontrer une grande flexibilité pour que le système puisse servir de plate-forme de caractérisation de réactions moléculaires diverses ou de types de substrats différents. Les spécifications de conception du système sont donc les suivantes :

1.4.1 Sensibilité

Le système doit démontrer une grande sensibilité et résolution. Il doit de plus être muni d'outils de calibration pour assurer la reproductibilité des mesures.

1.4.2 Flexibilité

Il doit permettre l'emploi de substrats de taille et d'indice de réfraction différents. Il doit être suffisamment modulaire pour permettre l'emploi de sources d'excitation différentes. Finalement, il doit permettre d'adapter la plage de détection pour caractériser différentes réactions moléculaires.

1.4.3 Substrats

Les substrats doivent être stables pour permettre la reproductibilité des mesures. Ils doivent aussi être compatibles avec les techniques de stérilisation conventionnelles pour permettre la croissance d'une population de cellules.

1.4.4 Fluidique

Le système doit comporter une cellule fluidique permettant d'exposer le substrat aux réactifs à étudier. Cette cellule fluidique doit pouvoir être employée avec des composés couramment utilisés en chimie, notamment l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane, l'acide trifluoroacétique et le diméthylformamide. Le design doit aussi être simple à nettoyer et facile à installer sur de nouveaux substrats, tout en étant complètement étanche.

1.4.5 Utilisation

Le système doit être simple d'emploi afin de permettre son utilisation par des chimistes et pharmacologues suite à une courte formation. Il doit donc être entièrement automatisé et muni d'outils d'analyse des résultats.

2 THÉORIE

2.1 Plasmon de surface: définition

Un plasmon de surface est une oscillation de la densité des charges électromagnétiques à l'interface entre un métal et un diélectrique. L'onde se propage de façon non radiative en surface, le long de l'interface métal – diélectrique [COLLINGS et coll., 1997]. Un plasmon de surface est excité en résonance par un rayon lumineux de polarisation transverse magnétique (TM) lorsque les quantités de mouvements sont équivalentes [MELENDEZ et coll., 1997].

Le champ électrique associé au plasmon de surface décroît de façon exponentielle en fonction de la distance dans le milieu. On remarque de plus que le champ électrique s'étend beaucoup plus à l'intérieur du diélectrique que dans le métal, comme le démontre la Figure 2.1 :

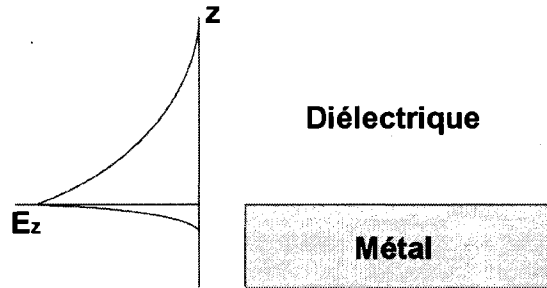


Figure 2.1 : Atténuation spatiale du champ évanescent des plasmons de surface

Le champ évanescent dans le diélectrique s'étend sur une distance de l'ordre de la moitié de la longueur d'onde en jeu. On voit que les plasmons de surface peuvent être employés pour la détection de particules à proximité d'un interface métal – diélectrique [BARNES, 2003].

Le vecteur d'onde d'un plasmon de surface, K_{sp} , peut être exprimé comme :

$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}} \quad (2-1)$$

Où ω est la fréquence angulaire (en radians par seconde), c la vitesse de la lumière dans le vide, ϵ_M et ϵ_D sont les permittivités du métal et du diélectrique, respectivement. Cette équation

décrit une onde de plasmon de surface si la partie réelle de ε_M est négative et sa valeur absolue inférieure à ε_D . Aux longueurs d'ondes optiques, cette condition est remplie pour plusieurs métaux, notamment l'or qui est le plus employé en détection SPR [HOMOLA, 2003]. On sait que le vecteur d'onde d'un rayon lumineux (K_L) dans un diélectrique est [HECHT, 2002]:

$$K_L = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_D} \quad (2-2)$$

La figure 2.2 illustre la relation de dispersion du vecteur d'onde d'un plasmon de surface dans un métal à surface lisse. La relation de dispersion d'un photon dans le diélectrique y est aussi représentée.

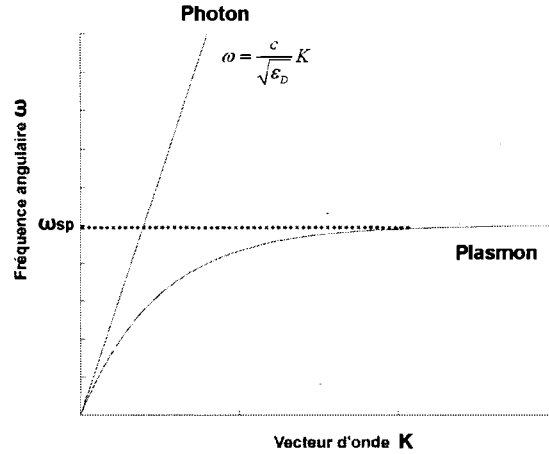


Figure 2.2 : Dispersion des plasmons de surface sur un métal et des photons dans un diélectrique

On remarque d'abord que la dispersion du plasmon de surface atteint un plateau à ω_{sp} . Aussi, le vecteur d'onde du plasmon de surface est situé à droite; il est plus grand que le vecteur d'onde des photons dans le diélectrique. Ceci signifie donc qu'il ne peut y avoir de couplage entre le plasmon de surface et un faisceau lumineux ambiant. Le plasmon de surface est non radiatif et il est impossible d'exciter les plasmons de surface en lumière ambiante [ZAYATS et coll., 2003]. Puisqu'il faut augmenter le vecteur d'onde des photons pour pouvoir coupler leur énergie aux plasmons de surface, l'emploi d'une technique de couplage est nécessaire pour activer la résonance [RAETHER, 1988].

2.2 Les techniques de couplage aux plasmons de surface

2.2.1 Le couplage par réflexion totale interne au sein d'un prisme

La réflexion totale atténuée dans un prisme, communément appelée le couplage de Kretschmann, est la technique la plus employée pour les appareils commerciaux [GREEN et coll., 2000]. Comme il est possible de voir sur la Figure 2.3, un film métallique est déposé sur un prisme de verre à fort indice de réfraction et un laser de polarisation transverse magnétique (TM) est envoyé à travers ce dernier. Un photodétecteur simple ou en réseau sert ensuite à enregistrer la puissance du laser qui est réfléchi à travers le prisme.

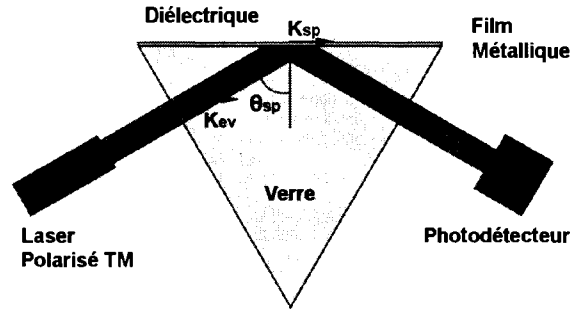


Figure 2.3 : Couplage plasmonique par la réflexion totale atténuée dans un prisme

La réflexion totale interne au sein du prisme vient créer un champ évanescent dont le vecteur d'onde, K_{ev} , est donné par l'équation suivante :

$$K_{ev} = \frac{\omega}{c} n_p \sin \theta \quad (2-3)$$

Où ω est la fréquence angulaire, c la vitesse de la lumière dans le vide, n_p l'indice de réfraction du prisme et θ l'angle d'incidence, mesuré à partir de la normale de la surface. Un couplage avec les plasmons de surface a lieu lorsque le vecteur d'onde $K_{sp} = K_{ev}$, nous donnant donc, lorsque l'on combine les équations 1 et 2 :

$$\theta_{sp} = \sin^{-1} \left(\frac{1}{n_p} \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}} \right) \quad (2-4)$$

Où θ_{sp} représente l'angle de couplage aux plasmons de surface. Il est donc possible de voir que l'angle de couplage aux plasmons de surface dépend de la permittivité du métal, de celle du diélectrique au-dessus de la couche métallique ainsi que de l'indice de réfraction du prisme

employé. La figure 2.4 montre à nouveau une figure de dispersion où l'on peut voir qu'il y a un croisement entre les dispersions.

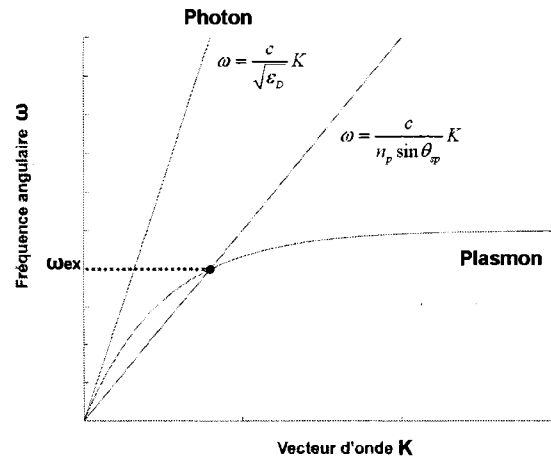


Figure 2.4 : Dispersion du vecteur d'onde des plasmons et des photons pour la réflexion totale atténuée

On remarque donc que pour une fréquence d'excitation ω_{ex} donnée, un seul angle de couplage, θ_{sp} , intercepte la dispersion des plasmons de surface et permet le couplage maximal.

Lorsque le laser est incident sur la surface métallisée du prisme près de l'angle θ_{sp} , une partie de sa puissance est transférée aux plasmons de surface, activant leur résonance, pour finalement obtenir un transfert maximal exactement à l'angle θ_{sp} . L'équation 2-4 montre aussi qu'une augmentation de la permittivité du diélectrique augmente la valeur de l'angle de couplage θ_{sp} . La figure 2.5 illustre le résultat du suivi de la puissance du laser réfléchi sur le substrat, en fonction de l'angle d'incidence, pour deux valeurs de permittivité du diélectrique.

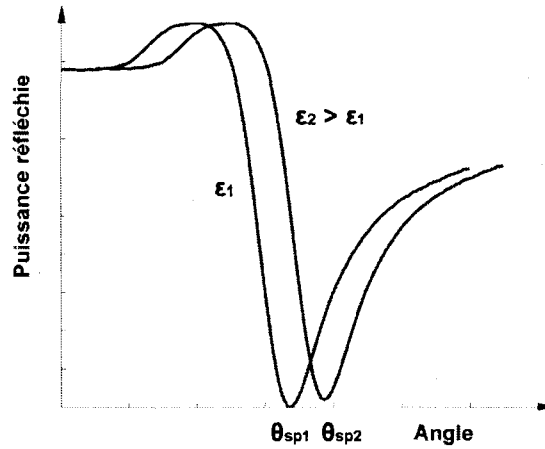


Figure 2.5 : Variation de l'angle de couplage aux plasmons de surface due au changement de permittivité du diélectrique

2.2.2 Le couplage à l'aide d'un réseau de diffraction

Une autre technique communément employée pour coupler un laser aux plasmons de surface est le réseau de diffraction [KANO et coll., 1995]. En posant l'hypothèse que les propriétés de dispersion de l'onde plasmonique ne sont pas affectées par le réseau de diffraction, une onde optique excitant une onde des plasmons de surface par un réseau de diffraction peut être décrite comme suit :

$$n_d \sin \theta + m \frac{\lambda}{\Lambda} = \pm \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}} \quad (2-5)$$

Où n_d représente l'indice de réfraction du diélectrique, θ est l'angle d'incidence de l'onde optique, λ la longueur d'onde du faisceau incident et Λ représente le pas du réseau de diffraction [HOMOLA et coll., 1999a].

Comme on peut voir sur la figure 2.6, lorsque le réseau de diffraction et le faisceau incident sont tous les deux du côté du diélectrique, il est possible de coupler le laser aux plasmons de surface.

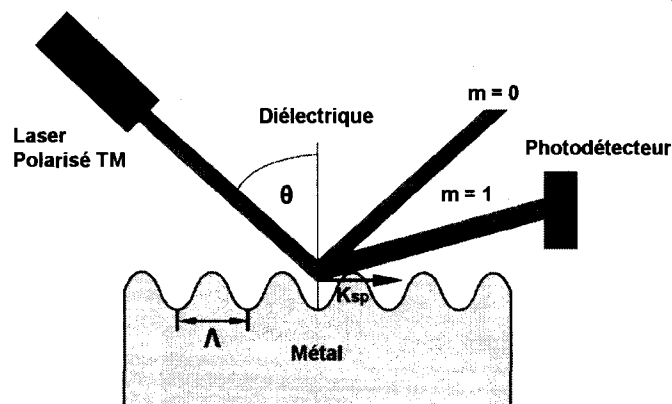


Figure 2.6 : Couplage plasmonique à l'aide d'un réseau de diffraction

Le signe positif de la partie droite de l'équation 2-5 représente les ordres de diffraction positifs ($m > 0$), et l'inverse pour les ordres négatifs ($m < 0$). À un ordre donné, le couplage avec les plasmons de surface se dénote encore une fois par une absorption quasi-complète de la puissance réfléchie.

Le principal avantage du couplage par réseau de diffraction est la possibilité de miniaturiser le dispositif, par rapport à la miniaturisation d'un prisme, qui est plus ardue. Par contre, puisque le faisceau incident et le réseau doivent être du côté du diélectrique et donc des réactifs à analyser, ceci vient limiter les applications d'un tel dispositif qu'aux milieux transparents et peu diffusants.

2.3 La SPR pour l'étude de réactions moléculaires

À la section 2.2.1, il a été démontré qu'un changement de la permittivité du diélectrique se traduit par un changement des conditions de couplage. On sait que l'indice de réfraction, n , peut être relié à la permittivité relative d'un milieu, ϵ_r , par l'approximation suivante [HECHT, 2002] :

$$n = \sqrt{\epsilon_r} \quad (2-6)$$

Puisque les biomolécules présentent normalement un indice de réfraction supérieur aux tampons dans lesquels ils sont employés, une adhésion sur le substrat se traduit généralement

par une augmentation de l'angle de couplage [SHUMAKER-PARRY et coll., 2004]. En effet, la présence de ces particules à l'intérieur du champ évanescent créé par la SPR vient légèrement modifier l'indice de réfraction effectif en surface. La SPR est donc sensible aux faibles variations de masse en surface du substrat [SCHUCK, 1997]. La figure 2.7 illustre l'effet sur l'angle de résonance de l'adhésion moléculaire sur un substrat SPR fonctionnalisé.

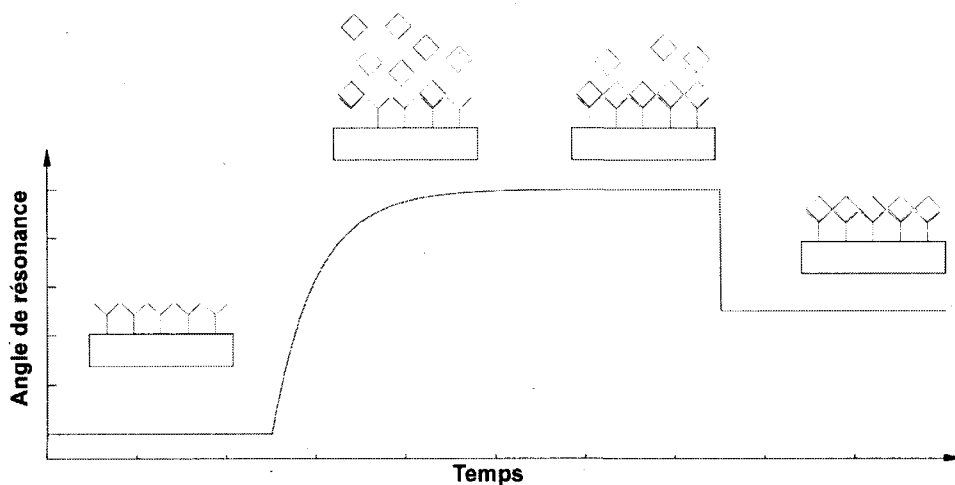


Figure 2.7 : Schéma représentant l'adhésion moléculaire affectant l'angle de résonance SPR

La sensibilité et la résolution d'un système de détection à base de résonance des plasmons de surface sont donc normalement évaluées en unités d'indice de réfraction (RIU).

2.4 La sélection du métal

Comme défini à la section 2.1, un métal peut supporter la résonance des plasmons de surface si la partie réelle de sa permittivité est négative et sa valeur absolue inférieure à la permittivité du diélectrique. Plusieurs métaux peuvent donc servir à la résonance des plasmons de surface, notamment l'or et l'argent qui sont les plus couramment employés [ONG et coll., 2006]. La permittivité des métaux varie en fonction des conditions d'évaporation; l'or et l'argent ont été mesurées respectivement à $-10.8 + i1,47$ et à $-17.6 + i0,67$ en condition de vide ultra élevé [RAETHER, 1988].

La sensibilité de la SPR dépend de la valeur absolue de la composante réelle de la permittivité du métal [HOMOLA, 1997]. Ceci se traduit par un couplage aux plasmons de surface

nettement plus large pour l'or que pour l'argent; l'or démontrant ainsi une sensibilité inférieure. L'argent démontre cependant une forte tendance à l'oxydation, diminuant donc ses capacités à être employé pour l'étude de réactions biomoléculaires par SPR alors que l'or est très stable [YUAN et coll., 2006].

2.5 Les alternatives de détection

2.5.1 L'évaluation de l'angle de couplage

Les techniques démontrées précédemment pour le couplage aux plasmons de surface ont été expliquées à l'aide de la technique d'interrogation angulaire, c'est-à-dire en regardant la puissance réfléchie pour chaque angle d'incidence de l'excitation. Deux méthodes sont normalement employées pour effectuer le montage d'un système de réflexion totale atténuée par prisme, soit l'emploi d'un goniomètre θ -2 θ ou l'emploi d'une source d'excitation focalisée [KRETSCHMANN, 1978].

Un goniomètre θ -2 θ consiste en l'emploi de deux moteurs rotatifs, montés l'un sur l'autre, permettant d'effectuer une rotation simultanée d'un angle donné pour un moteur, et du double de l'angle pour le second. Il est ainsi possible d'effectuer la rotation d'un prisme tout en conservant le faisceau d'excitation sur un photodétecteur, qui lui doit se déplacer du double de la distance. La figure 2.8a illustre le montage d'un système SPR basé sur un goniomètre.

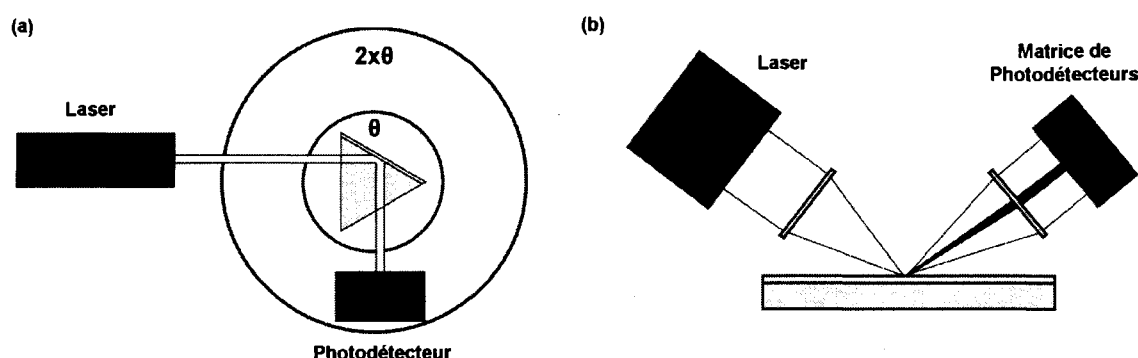


Figure 2.8 : Configurations usuelles pour une interrogation angulaire couplée par prisme

Une source d'excitation focalisée permet d'effectuer l'interrogation angulaire sans pièce mobile. Effectivement, en focalisant la source d'excitation sur le substrat SPR, on excite

simultanément une plage d'angles d'incidence. Le faisceau divergent reflété sur le substrat est ensuite collecté sur une caméra ou un réseau de photodétecteurs et analysé en recherchant une ligne de pixels où l'intensité réfléchie est quasi-totalement atténuée, comme le montre la figure 2.8b. Le montage par excitation focalisée permet donc une acquisition plus rapide, mais nécessite un algorithme de localisation de la bande d'absorption.

Les techniques de couplage énumérées plus haut peuvent être employées avec d'autres méthodes de détection, soit l'évaluation de la longueur d'onde de couplage, la variation de puissance à angle donné ou la différence de phase.

2.5.2 L'évaluation de la longueur d'onde de couplage

La chute d'absorption due au couplage plasmonique peut aussi être observée à angle fixe lorsque l'on varie la longueur d'onde d'excitation [HOMOLA, 2006]. Selon le modèle de Drude, on obtient la valeur de la permittivité d'un métal par la relation suivante :

$$\varepsilon_m(\lambda) = 1 - \frac{\lambda^2 \lambda_c}{\lambda_p^2 (\lambda_c + i\lambda)} \quad (2-7)$$

Où λ représente la longueur d'onde incidente, alors que λ_c et λ_p représentent respectivement la longueur d'onde de collision et la longueur d'onde de plasma, toutes deux caractéristiques intrinsèques du métal employé [HOMOLA, 1997]. Lorsque l'on fixe l'angle d'interrogation et que la longueur d'onde d'excitation est variée, la permittivité du métal change et permet un couplage à l'onde plasmonique pour une valeur spécifique de longueur d'onde d'interrogation.

Les systèmes à interrogation spectrale nécessitent l'emploi de sources d'excitation ajustables ou à large spectre d'émission. Un spectrophotomètre ou un spectrographe permet ensuite de mesurer l'absorption lumineuse spécifique pour chaque longueur d'onde de la plage de détection [DOSTALEK et coll., 2005].

2.5.3 L'évaluation de la puissance à angle fixé

Il peut aussi être intéressant de regarder comment, à angle et longueur d'onde fixes, la puissance réfléchie peut varier en fonction du temps. La figure 2.9a montre deux courbes de puissance réfléchie en fonction de l'angle, pour une longueur d'onde fixe, décrivant un changement d'indice de réfraction en surface. Le résultat équivalent du suivi de la puissance réfléchie sur un substrat SPR en fonction du temps, lorsqu'un photodétecteur est maintenu à l'angle θ_{fixe} , est montré à la figure 2.9b.

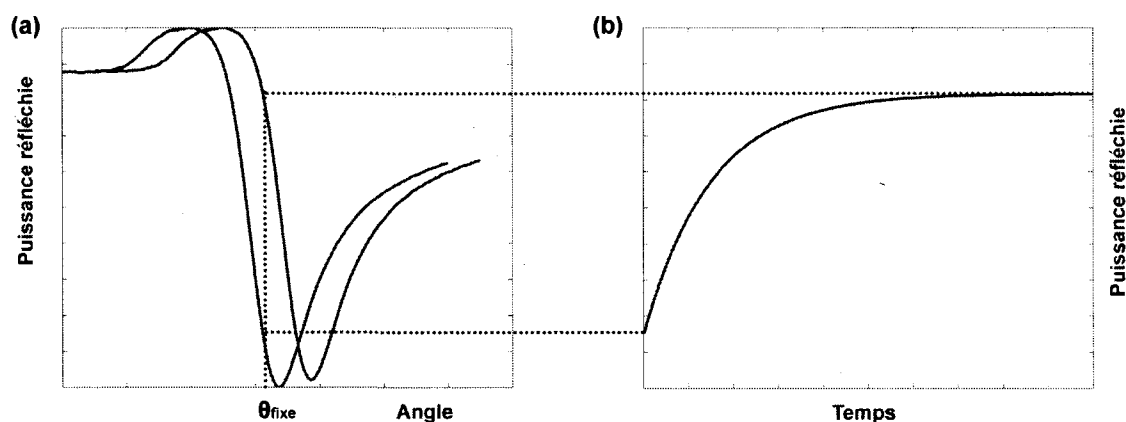


Figure 2.9 : Suivi de la puissance en fonction du temps pour une variation d'indice de réfraction

On remarque qu'à l'angle θ_{fixe} , positionné dans la plage linéaire de la réponse SPR, la variation de l'indice de réfraction équivaut à une augmentation proportionnelle de la puissance réfléchie.

Lorsque la résonance des plasmons de surface est employée pour évaluer des interactions moléculaires ou pharmacologiques, il est possible de directement retirer de la variation de puissance la cinétique d'une réaction ou la valeur des constantes d'association et de dissociation des composés étudiés. Cette alternative de détection permet donc de s'affranchir des algorithmes de localisation du maximum d'absorption. Cependant, la plage de détection est faible, puisque les variations de l'indice de réfraction en surface doivent demeurer dans le régime linéaire de la réponse SPR [HOMOLA et coll., 1999b].

2.5.4 L'évaluation de la différence de phase

Les techniques de détection décrites plus haut ne tiennent compte que du terme d'amplitude dans l'intensité réfléchi. Qu'advient-il de la phase? La polarisation TM, près de l'angle de couplage, varie drastiquement sur une faible gamme d'angles [NELSON et coll., 1996]. Comme expliqué à la section 2.2.1, la configuration par prisme nécessite l'emploi d'un laser de polarisation TM pour créer le champ évanescent nécessaire au couplage avec les plasmons de surface. L'énergie de la polarisation TE, quant à elle, ne peut être transférée à l'onde plasmonique. Il est donc possible de suivre la différence de phase entre ces deux polarisations du laser à travers le temps ou pendant un balayage angulaire [HOMOLA, 2003]. La figure 2.10 montre la variation de phase équivalente pour une variation d'indice de réfraction donnée.

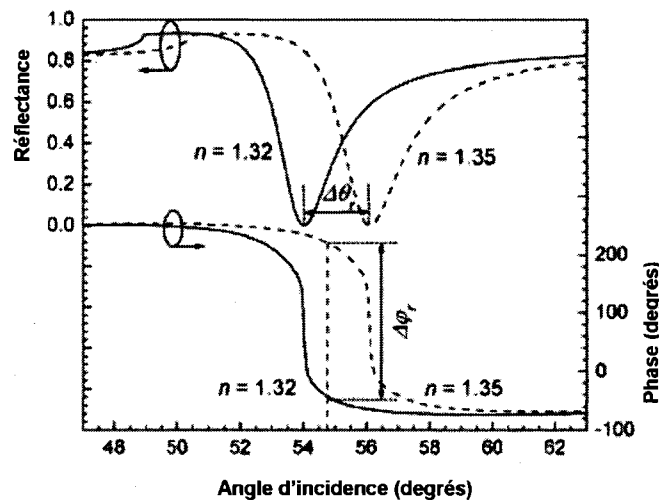


Figure 2.10 : Différence de phase entre les polarisations TM et TE pour une variation d'indice de réfraction donnée [HOMOLA, 2003]

La pente du changement de phase étant très élevée, l'interrogation par phase permet une plus grande résolution que les méthodes utilisant simplement l'intensité, allant jusqu'à obtenir une résolution théorique de 1×10^{-7} RIU [YU et coll., 2003]. L'interrogation par phase nécessite cependant de l'équipement plus complexe, comme l'emploi d'un interféromètre Mach-Zender sur le bras duquel la détection SPR doit être installée ou une détection hétérodyne [YU et coll., 2001, NIKITIN et coll., 1999].

À titre comparatif, le tableau 2.1 indique le degré de résolution obtenu à l'aide des différentes méthodes de détection de l'intensité seule.

Tableau 2.1 : Résolution théorique des couplages par prisme et réseau en fonction du type d'interrogation, donnée en unités d'indice de réfraction (RIU) [HOMOLA et coll., 1999a]

	Interrogation angulaire Résolution en $\theta = 1 \times 10^{-4}$ degrés		Interrogation spectrale Résolution en $\lambda = 0.02$ nm		Mesure d'intensité Résolution en puissance = 0.2%	
	$\lambda=630\text{nm}$	$\lambda=850\text{nm}$	$\lambda=630\text{nm}$	$\lambda=850\text{nm}$	$\lambda=630\text{nm}$	$\lambda=850\text{nm}$
Couplage par prisme	5×10^{-7}	1×10^{-6}	2×10^{-5}	1×10^{-6}	5×10^{-5}	1×10^{-5}
Couplage par réseau	2×10^{-6}	2×10^{-6}	6×10^{-5}	3×10^{-5}	2×10^{-4}	5×10^{-5}

On remarque que le couplage par prisme permet d'obtenir une résolution nettement supérieure au couplage à l'aide d'un réseau de diffraction. On voit de plus que la mesure d'intensité seule démontre une résolution plus faible que l'interrogation angulaire ou spectrale. Finalement, l'interrogation spectrale est sensiblement aussi précise que l'interrogation angulaire lorsqu'on travaille à longueur d'onde élevée, mais moins sensible lorsqu'on emploie un laser rouge à 630 nm. La meilleure résolution est donc obtenue en interrogation de phase, comme il a été mentionné plus haut. L'interrogation angulaire à faible longueur d'onde avec un couplage par prisme permet elle aussi d'obtenir une très bonne résolution.

2.6 Les méthodes de traitement des résultats

2.6.1 La normalisation de la réflectance

Plusieurs effets parasites, tels les variations de puissance de la source d'excitation ou la diffraction causée par le prisme, peuvent altérer les données d'un système SPR. Les résultats doivent donc être optimisés par une normalisation des données mesurées afin de compenser ces variations [NENNINGER et coll., 2002]. Comme discuté à la section 2.5.4, la polarisation TE ne peut être couplée aux plasmons de surface. Elle peut donc être employée à titre de référence, afin de diminuer, voire même annuler, l'effet des variations de puissance du laser ou la diffraction au sein du prisme, puisqu'elle subit tout de même ces effets parasites. Les résultats SPR peuvent donc être présentés en terme de variation de la réflectance. La figure

2.11 montre la normalisation des données de polarisation TM en divisant par la polarisation TE.

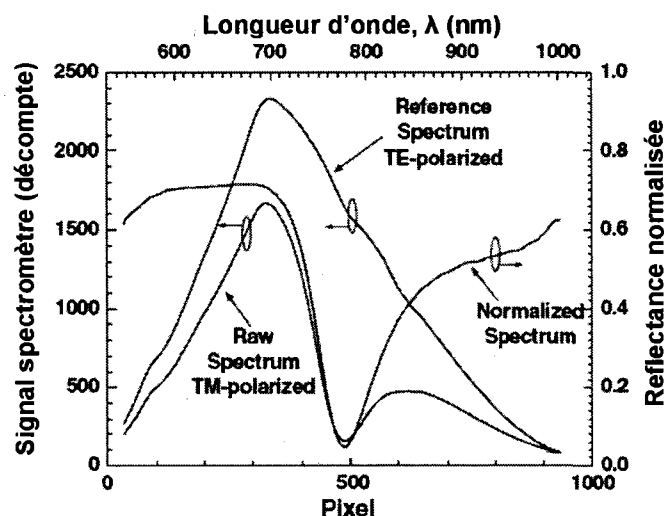


Figure 2.11 : Normalisation des données à l'aide de la polarisation TE pour une interrogation spectrale [NENNINGER et coll., 2002]

Aussi, la résolution énoncée à la section 2.5.4 étant la limite ultime de détection liée aux composantes matérielles de l'appareil, la précision des mesures est, quant à elle, restreinte par l'algorithme d'interprétation des résultats employé. Les algorithmes communément utilisés pour localiser l'angle de couplage sont la méthode centroïde, la modélisation polynomiale, la ligne de base dynamique et la modélisation paramétrique.

2.6.2 Le traitement par méthode centroïde

La méthode centroïde consiste à prendre une valeur seuil et à l'appliquer sur la courbe de réflectance. La section de la courbe SPR se situant sous ce seuil est ensuite approximée à un triangle isocèle duquel on détermine le point minimum [CHINOWSKY et coll., 1999]. Puisque la chute de la courbe de réflectance SPR n'est pas symétrique, le point minimal obtenu à l'aide de cette méthode n'est pas le vrai minimum, ce qui est un désavantage significatif de cette méthode d'analyse. De plus, il est connu que la largeur et l'asymétrie du minimum de la courbe SPR augmentent avec l'accroissement de l'indice de réfraction [HOMOLA, 2006]. Cette méthode convient donc lorsqu'il s'agit de comparer deux courbes de faible écart d'indices. Aussi, la section de la courbe choisie étant déterminée par une valeur

seuil, cet algorithme est très sensible aux bruits venant s'ajouter à la courbe, par exemple la variation de puissance de la source d'excitation.

2.6.3 L'analyse par modélisation polynomiale

La modélisation polynomiale consiste à définir un polynôme affichant une réponse similaire à celle de la courbe à analyser et ensuite à l'appliquer sur la section minimale. Les données à modéliser sont encore une fois déterminées à l'aide d'une valeur seuil. Cette technique permet de tenir compte de l'asymétrie de la courbe de réflectance, mais présente elle aussi une sensibilité aux bruits due à l'emploi d'une valeur seuil fixe pour sélectionner les données à modéliser. La figure 2.12 compare l'application de la méthode centroïde et de la modélisation polynomiale pour la localisation d'un minimum SPR.

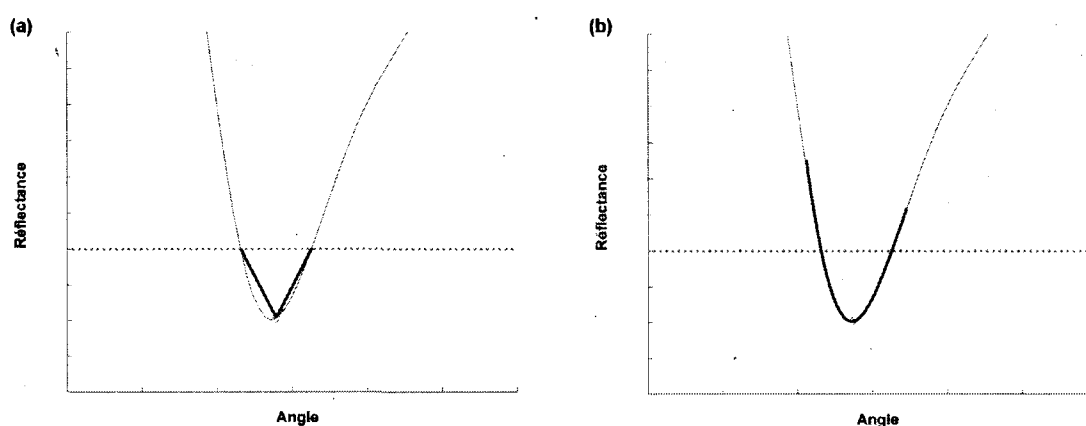


Figure 2.12 : Comparaison entre la méthode centroïde (a) et la modélisation polynomiale (b)

2.6.4 L'algorithme de ligne de base dynamique

La ligne de base dynamique est une variation des méthodes précédentes, consistant à appliquer une valeur seuil variable pour la sélection des données. Cette valeur seuil est modifiée dynamiquement de sorte à conserver un ratio constant entre l'aire de la section sélectionnée et celle du reste de la courbe de réflectance [THIRSTRUP et coll., 2005]. On considère donc que la section minimale de la courbe ne s'élargit pas, mais peut varier horizontalement dû à un changement d'indice de réfraction, ou verticalement dû au bruit. La ligne de base dynamique peut aussi bien être suivie d'une technique centroïde que d'une modélisation paramétrique. Elle ne permet que de sélectionner la partie de courbe à traiter

avec plus de rigueur en éliminant le bruit dû aux variations d'intensité. Un exemple de l'emploi de la méthode de ligne de base dynamique est donné à la figure 2.13.

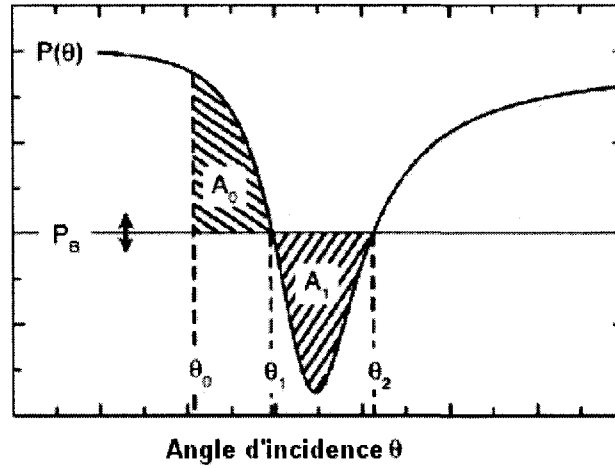


Figure 2.13 : Exemple d'application de la ligne de base dynamique [THIRSTRUP et coll., 2005]

2.6.5 L'analyse par modélisation paramétrique

La méthode de modélisation paramétrique n'a présentement été appliquée qu'aux systèmes fonctionnant par interrogation spectrale. Elle repose sur le fait que la réflectivité spectrale peut être modélisée à l'aide d'un profil de Lorentz [TOBISKA et coll., 2005].

$$R(\lambda) \approx 1 - A \frac{W + P(\lambda - C)}{W^2 + (\lambda - C)^2} \quad (2-8)$$

Cette relation définit le modèle de Lorentz, régi par une série de paramètres, soit A la profondeur du minimum, P son asymétrie, C sa position et W sa largeur. La variable à l'étude est la matrice $A = [a_s, a_b]$, où a_s représente la variation d'indice de réfraction en surface de l'échantillon et a_b , la variation dans la totalité du champ évanescent. Le modèle est ensuite linéarisé autour d'un point d'opération et appliqué à l'ensemble de la courbe de réflectance obtenue. La modélisation paramétrique, puisqu'elle tient compte de la totalité des données obtenues et évalue une série de paramètres, permet d'obtenir plus d'information à partir des mêmes mesures par rapport aux méthodes conventionnelles.

3 CONCEPTION ET CARACTÉRISATION DU SYSTÈME SPR

3.1 La conception du système

3.1.1 La sélection de la méthode de détection

Suite à l'évaluation des différentes techniques de couplage, il a été déterminé qu'il était préférable d'opter pour un couplage par prisme basé sur la méthode de Kretschmann. En effet, comme démontré à la section 2.2.1, le couplage par prisme démontre une meilleure résolution que l'emploi d'un réseau de diffraction. Puisqu'une spécification du système était de démontrer une bonne flexibilité quant aux substrats et aux composantes employées, il était aussi plus facile de fonctionner avec un couplage par prisme.

Au niveau de la méthode de détection employée, il a été énoncé à la section 2.5.4 que la détection par phase offre la meilleure résolution. Cependant, il a aussi été mentionné que cette technique est peu flexible et nécessite de l'équipement complexe. Selon les spécifications du système, la méthode choisie devait se prêter à la modularité et donc permettre l'emploi de plusieurs sources d'excitations, ou même d'un prisme à indice de réfraction différent. Pour y répondre, deux alternatives de détection ont été combinées, soit l'évaluation de l'angle de couplage et la mesure de réflectance à angle fixé. Comme énuméré dans le tableau 1, l'évaluation de l'angle de couplage pour une source d'excitation à 630nm donne une excellente résolution. La mesure de réflectance à angle fixé, quant à elle, permet d'obtenir directement la cinétique d'une réaction par les données SPR brutes, sans appliquer d'algorithme d'analyse des résultats.

Une spécification du système étant la flexibilité quant aux substrats à employer, le choix du type de prisme s'est arrêté sur un prisme équilatéral en BK7. En effet, l'ajout d'un substrat plus large sur un prisme équilatéral n'en changeant pas la forme, ce type de prisme rendait donc possible le fonctionnement du système avec des substrats d'épaisseurs différentes, moyennant un réalignement. De plus, le BK7 ayant un indice de réfraction très similaire à celui du verre ($n \sim 1.515$ à 635nm [*Five Schott Glass Types*, 2008]), le dépôt métallique nécessaire au support de l'onde plasmonique pouvait donc être déposé sur des lames de verre

standards employées en microscopie. Pour éviter la réflexion totale interne causée par l'air présent à l'interface entre le substrat et le prisme, une huile d'indice de réfraction similaire au BK7 (1.514) a été employée.

Comme décrit à la section 2.5.1, deux méthodes sont communément employées pour effectuer le montage d'un système d'interrogation angulaire basé sur un couplage par prisme, soit le goniomètre ou la source d'excitation focalisée. En focalisant la source d'excitation, on se contraint à employer un algorithme de détection de la position de la bande d'absorption lumineuse. Ce type de montage démontrant cependant moins de flexibilité, il était préférable d'employer un montage en goniomètre. Aussi, la détection à angle fixé démontre normalement une faible plage dynamique, limitée à la région linéaire de la courbe de réflectance. Le montage d'un goniomètre permettait de sélectionner l'angle de suivi et donc de centrer la plage de détection sur la gamme d'indices de réfraction à mesurer.

3.1.2 La fabrication du goniomètre

Pour faciliter l'utilisation du système sans employer de pompes, le goniomètre a été conçu à la verticale. Effectivement, il était ainsi plus facile d'introduire et retirer des réactifs dans une cellule fluide directement au-dessus du substrat. Deux moteurs rotatifs, fixés l'un sur l'autre et munis de bras individuels, permettaient de modifier l'angle d'incidence du laser tout en conservant le faisceau réfléchi centré sur le photodétecteur. Un stage micrométrique servant à l'alignement a été installé pour chaque dimension de l'appareil. La figure 3.1 illustre le montage mécanique du goniomètre vertical.

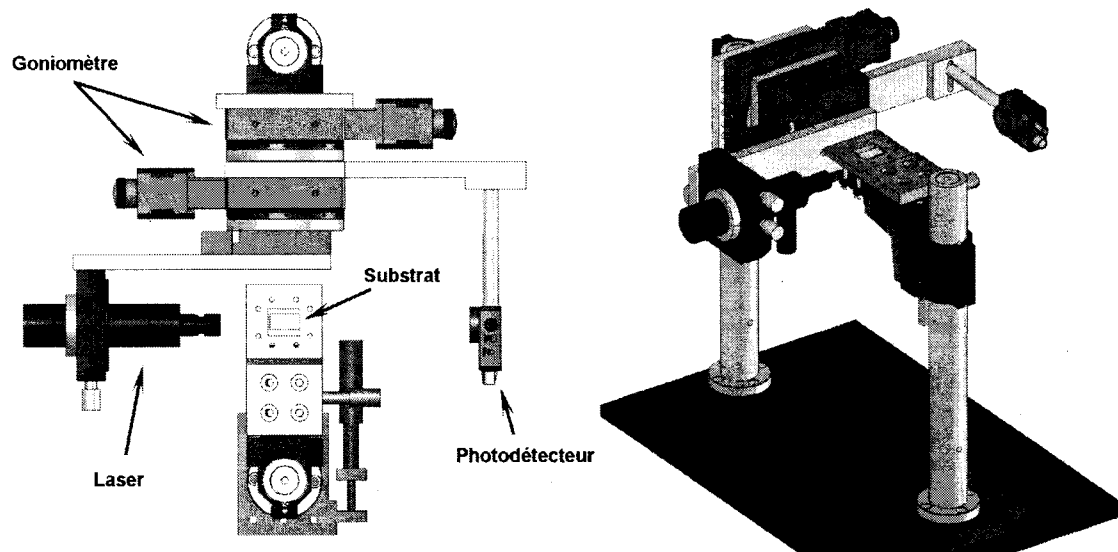


Figure 3.1 : Représentation du dessus et représentation isométrique du système SPR

Pour l'excitation des plasmons, une diode laser rouge centrée à 635nm a été employée. Cette diode était munie d'un système de contrôle en température pour améliorer sa stabilité à court et long terme. Comme décrit à la section 2.1, la résonance des plasmons de surface nécessite une excitation lumineuse de polarisation transverse magnétique (TM), alors que la diode était polarisée transverse électrique (TE). Pour remédier à ce problème, une lame de retard de phase $\lambda/2$ a dû être insérée entre le laser et le substrat. Il est connu qu'une lame de retard de phase, en appliquant un retard de phase différent à ses composantes horizontale et verticale, permet de modifier la polarisation d'un faisceau laser [HECHT, 2002].

3.1.3 La fabrication des substrats

Comme décrit à la section 3.1.1, le prisme sélectionné permettait l'emploi d'une lame de verre métallisée comme substrat SPR. Le dépôt sur verre d'une couche métallique additionnelle est toutefois nécessaire pour améliorer l'adhésion entre l'or ou l'argent et le support de verre. Sans couche d'ancrage, l'or et l'argent ne sont pas déposés de manière stable sur le verre, et ne peuvent pas résister à un traitement chimique sévère [EKGASIT et coll., 2005]. À cet effet, compte tenu de sa qualité en terme de couche adhésive, une couche de 3nm de chrome a été déposée sur le verre avant d'évaporer les autres métaux, [SCHNEIDER et coll., 2003].

L'or est le métal le plus couramment employé puisqu'il est stable et que sa fonctionnalisation chimique est bien documentée [ONG et coll., 2006, SCHREIBER, 2000]. Comme discuté à la section 2.4, l'argent démontre cependant une meilleure sensibilité pour la résonance des plasmons de surface. Des tests sur substrats d'or et substrats d'argent ont donc été réalisés pour effectuer la sélection du métal. Les épaisseurs pour l'or et l'argent ont été optimisées respectivement à 48nm et 52nm à l'aide du logiciel The Essential Macleod de Thin Film Center, inc. La figure 3.2 montre les résultats de simulation et d'expérimentation pour ces épaisseurs d'or et d'argent.

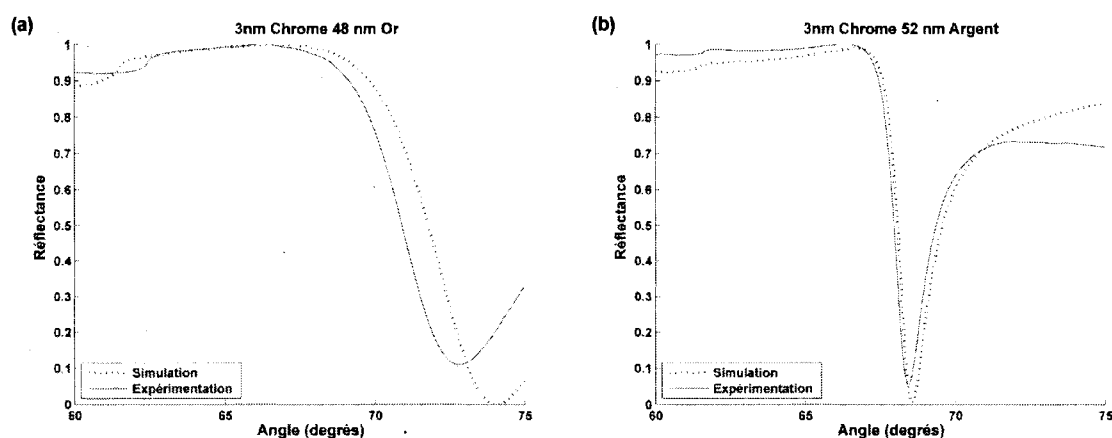


Figure 3.2 : Comparaison par simulation et par expérimentation des résultats SPR pour des substrats d'or (a) et d'argent (b)

À noter que les différences entre les angles de couplage simulés et expérimentaux correspondent à des différences entre les valeurs de permittivité du modèle et celles des métaux déposés. On remarque que l'argent présente un minimum beaucoup plus étroit à l'angle de couplage par rapport à l'or. De plus, le minimum de réflectance pour l'argent survient à un angle plus faible que pour l'or. Cependant, les substrats d'argent démontraient une très faible stabilité aux composés chimiques réactifs. De plus, ils s'oxydaient très rapidement, rendant leur surface hétérogène. Ils ont donc été abandonnés en faveur des substrats d'or.

Un dépôt additionnel de 5nm de silice (SiO_2) a été réalisé sur certains substrats d'or pour diversifier la plage de réactions moléculaires observables à partir de l'appareil. En effet, l'or présentant une grande réactivité aux groupements thiol, il était impossible d'étudier des

réactions impliquant de tels groupements sur des substrats d'or préalablement fonctionnalisés, par exemple une réaction de ligation chimique native qui utilise un catalyseur contenant un thiol [WIECZERZAK et coll., 2008]. Cette fine couche de silice devait permettre de réaliser une fonctionnalisation chimique typiquement effectuée sur lames de verre [PHILLIPS et coll., 2006]. Les substrats d'or ainsi que les substrats d'or recouverts de silice étaient très stables et ont permis d'effectuer la caractérisation du système.

Pour fabriquer les échantillons décrits précédemment, des lames de microscopie étaient nettoyées selon une procédure standard de nettoyage du verre avant de procéder au dépôt métallique. Elles subissaient d'abord un frottement mécanique dans du savon optique avant d'être immergées dans une solution d'acide piranha, composé d'acide sulfurique et de peroxyde d'hydrogène 30% dans une proportion 3 : 1. Elles étaient ensuite rincées dans l'eau et l'alcool isopropylique, puis séchées sous jet d'azote. Pour déposer le chrome et l'or sur les lames de verre, elles étaient placées dans un évaporateur à canon d'électrons BOC Edwards. Pour les substrats chrome et argent, les lames de verre étaient placées dans un évaporateur à canon d'électrons Sloan. À noter que pour les deux dépôts, le vide n'était pas brisé entre les évaporations de chrome et d'argent ou d'or. Finalement, pour la couche de silice, elle était réalisée par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma dans un système de Surface Technology Systems.

3.1.4 La cellule fluide

Afin de permettre l'emploi du système SPR pour caractériser des réactions moléculaires variées, celle-ci devait être équipée d'une cellule fluide permettant d'exposer le substrat SPR aux réactifs à analyser. Comme décrit dans les spécifications, une attention particulière a dû être portée à la résistance chimique du matériau constituant cette cellule fluide.

Le choix de design s'est arrêté sur une chambre sans pompe fabriquée en Teflon™. Le Teflon™ est inerte et reconnu pour sa résistance aux acides, bases et solvants, de même que pour sa forte hydrophobicité, ce qui limite l'adhésion des réactifs employés sur les parois de la

cellule [FLEMING et coll., 2008]. La figure 3.3 montre des vues 3D de la cellule fluidique, de même que la fixation de la cellule sur le substrat et le support à prisme.

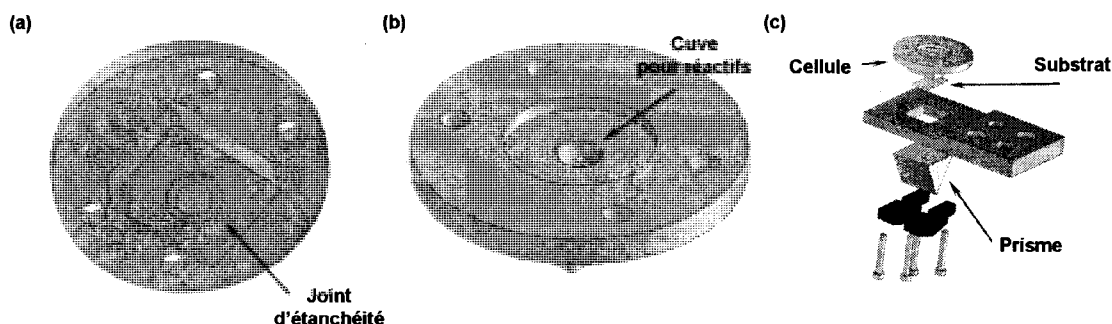


Figure 3.3 : Illustrations de la cellule fluidique et de son installation

Sur la section (a), il est possible de voir un joint d'étanchéité intégré à même la chambre. Le Teflon™ est un matériau compressible et en vissant la cellule fluidique sur le support à prisme, la pression exercée sur ce joint était suffisante pour conserver l'étanchéité. La section (b) montre la cuve où les réactifs sont insérés. En (c), une vue éclatée du montage de cellule fluidique sur le prisme est illustrée.

3.1.5 La normalisation de la réponse

Tel que discuté au chapitre 2, plusieurs effets parasites tels la diffraction causée par le prisme ou les variations de température peuvent altérer les données. Afin de compenser ces variations, une normalisation des données mesurées peut être effectuée en employant la polarisation transverse électrique (TE ou polarisation s). Pour implémenter cette normalisation, des composantes optiques ont dû être ajoutées à la plate-forme. En particulier, un polarisateur linéaire, dont la rotation est assurée par un moteur automatisé, a été inséré entre le substrat SPR et le photodétecteur, comme le montre la figure 3.4.

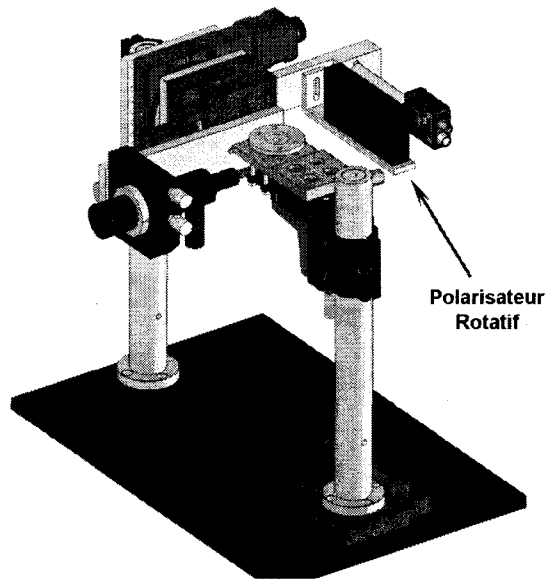


Figure 3.4 : Insertion d'un polarisateur rotatif entre le prisme et le photodétecteur pour effectuer la normalisation

Grâce à la lame de retard $\lambda/2$ déjà montée sur la diode laser, il était possible d'illuminer le substrat SPR avec un laser polarisé linéairement à 45° . Le polarisateur rotatif nous permettait donc de mesurer tour à tour la polarisation TM et TE, et ainsi d'obtenir la réflectance totale en fonction de l'angle, calculée comme le ratio de ces deux mesures.

3.1.6 L'optimisation de la détection

Lors de la conception initiale du système, un détecteur 1830-C équipé d'une tête de détection 818-UV de Newport était employé pour effectuer la mesure de l'intensité lumineuse. Ce détecteur était calibré de façon à obtenir une valeur précise de la puissance absolue du laser, exprimée en Watts. Par contre, sa sensibilité à faible puissance affectait l'atténuation maximale mesurée à l'angle de couplage. Il est connu qu'une bonne sensibilité à faible puissance permet d'améliorer la sensibilité d'un système SPR [NENNINGER et coll., 2002]. Ce détecteur a donc été remplacé par un photodétecteur DET100A de Thorlabs. Cependant, ce détecteur n'étant pas calibré, il ne permettait pas d'obtenir une valeur précise de la puissance mesurée en Watts. Comme les mesures du système SPR sont normalisées et représentent le ratio de la puissance réfléchie pour chacune des polarisations, il était tout de même possible d'employer ce détecteur pour obtenir des mesures relatives. La figure 3.5 montre une comparaison entre la réponse SPR typique avec chacun des détecteurs pour un substrat d'or.

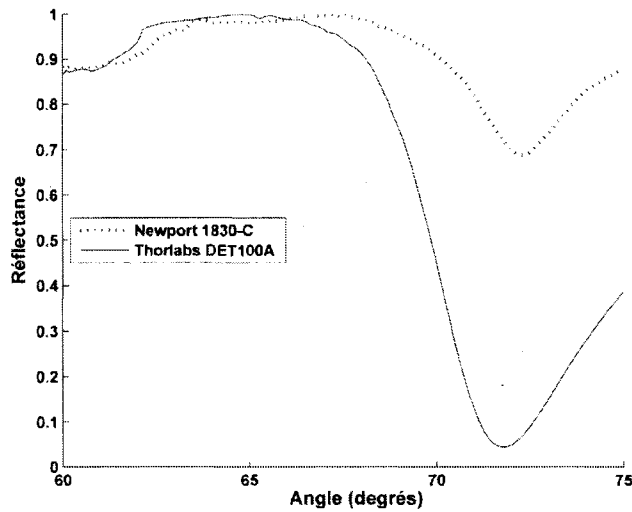


Figure 3.5 : Réponse SPR typique avec un détecteur 1830-C équipé d'une tête de détection 818-UV de Newport et avec un détecteur DET100A de Thorlabs

On y remarque que la pente du régime linéaire est nettement plus abrupte et que le minimum de la courbe SPR se situe à une valeur de réflectance inférieure, améliorant donc la sensibilité du système.

Pour isoler le système du bruit causé par l'illumination ambiante, un tube de lentille, servant à collecter la lumière provenant uniquement du substrat, ainsi qu'un filtre passe-bande étroit ont été ajoutés au photodétecteur. Le filtre était centré à 630nm avec une bande passante de 10nm. La figure 3.6 illustre sous forme de schéma l'ensemble des composantes optiques du montage final.

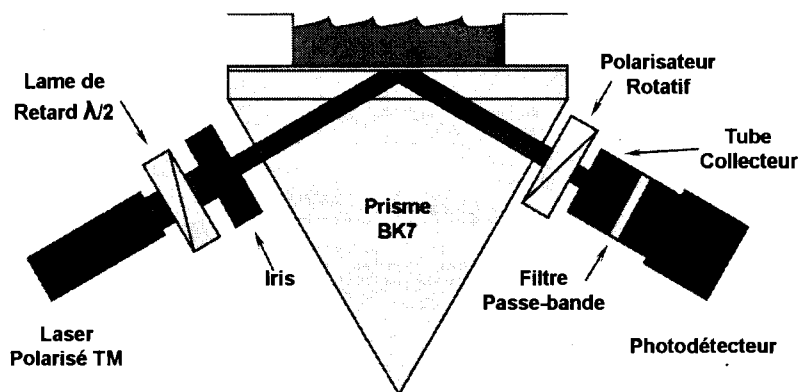


Figure 3.6 : Schéma représentant le montage optique final du système SPR

3.1.7 L'installation du système

Le système a été installé à la Faculté de Médecine et des Sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke afin de faciliter son utilisation pour la caractérisation de réactions biomoléculaires. La communication avec les différents modules et l'interface utilisateur sont accessibles via un PC. Les figures 3.7 et 3.8 montrent le système sous divers angles.

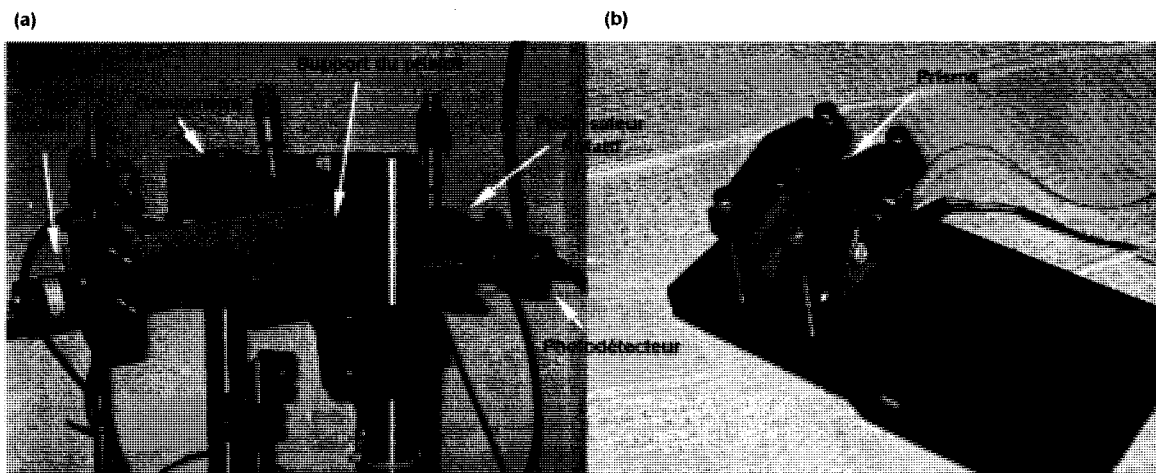


Figure 3.7 : Photos montrant le système SPR (a) et le prisme fixé sur son support (b)

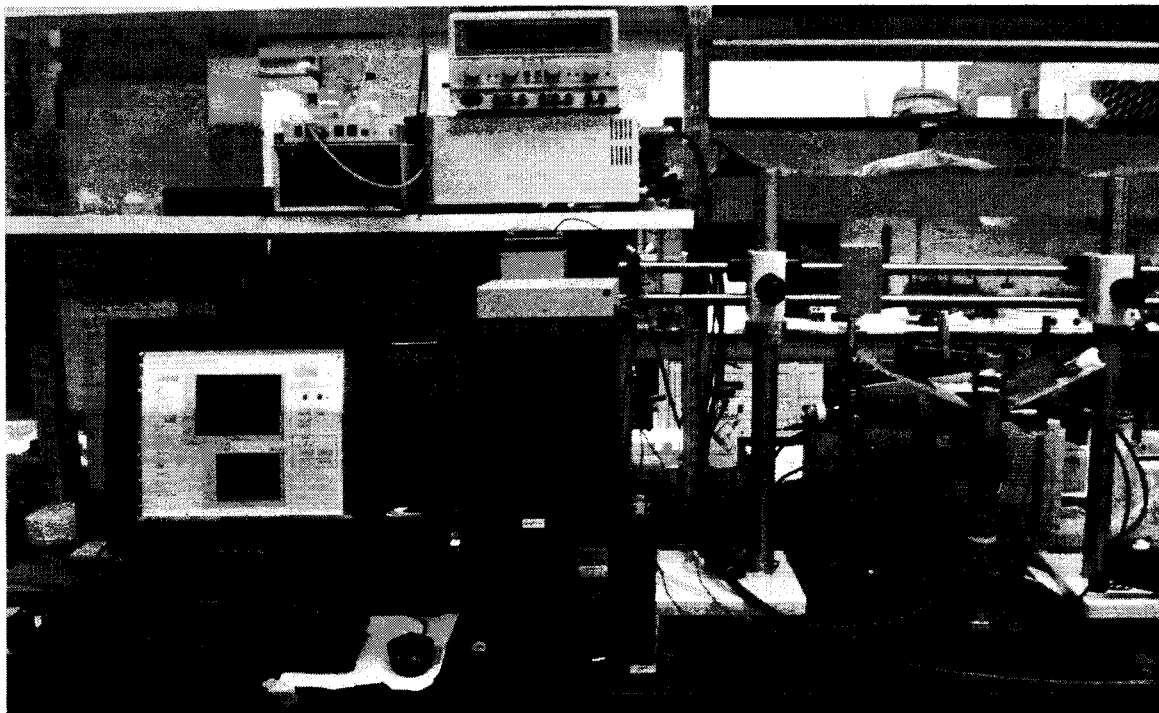


Figure 3.8 : Vue globale du système SPR

3.2 Logiciels de contrôle et d'analyse

3.2.1 Le logiciel de contrôle

Le contrôle du système SPR a été réalisé dans l'environnement LabVIEW. Les commandes aux moteurs pour le déplacement angulaire étaient passées à travers une routine ActiveX provenant du fournisseur, par un port USB. Le moteur de contrôle de la polarisation, employé pour normaliser les valeurs de réflectance, était contrôlé à l'aide de commandes envoyées selon le protocole RS232 par un port série. Une carte NI PCI-6221 de National Instrument permettait de faire l'acquisition des données du photodétecteur. Le signal, sur 10V, était échantillonné par un convertisseur analogique à numérique de 16 bits à même la carte d'acquisition. Chaque mesure représentait la moyenne de 125 acquisitions sur le photodétecteur à une fréquence de 1000 points à la seconde. La routine d'acquisition cyclait toutes les 250ms, en prenant 125 points pendant la moitié du temps et procédant au traitement dans la seconde moitié. Lors d'un balayage angulaire, cet intervalle de temps représentait une variation moyenne d'angle de 0.0814° avec une déviation standard de 0.0013. Le temps d'un balayage angulaire référencé de 60 à 75 degrés est évalué à 1 minute 51 secondes. Pour un

suivi de puissance à angle fixé, la vitesse maximale de rotation du moteur ne permettait d'obtenir qu'une mesure normalisée par 12 secondes. Les mesures SPR étaient ensuite affichées en temps réel sur l'interface utilisateur et finalement sauvegardées dans des fichiers Microsoft Excel. La Figure 3.9 illustre les onglets balayage angulaire (a) et suivi à angle fixe (b) de l'interface utilisateur pour le logiciel de contrôle.

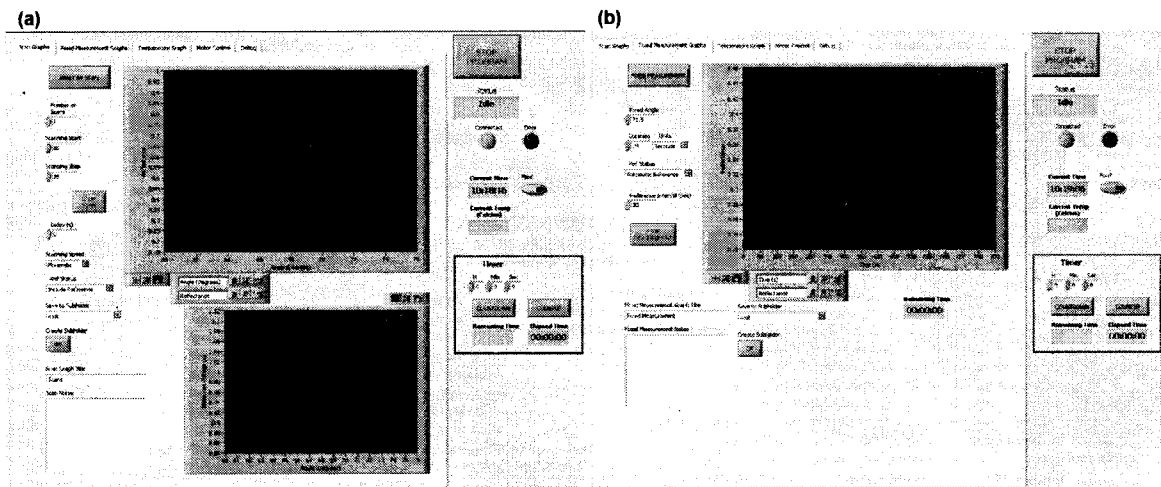


Figure 3.9 : Interface de contrôle du système SPR

Les résultats de balayages angulaires étaient sous la forme de graphiques donnant la mesure de réflectance pour chaque angle d'incidence. Les résultats de suivis à angle fixe étaient obtenus sous la forme de graphiques reliant la variation de réflectance en fonction du temps. Une unité de variation de réflectance (RVU) est définie comme un changement de l'ordre de 0.1% de la réflectance totale.

3.2.2 La calibration automatique de la plate-forme

Une routine de calibration générale du système a été implémentée afin d'assurer un alignement optique optimal et une bonne reproductibilité des résultats. Tout d'abord, les moteurs étaient calibrés grâce à la sous-routine du manufacturier. Ensuite, un interrupteur permettait d'étalonner le bras supportant le laser avec l'origine réelle (0°) du système. Puis, le bras du laser était positionné à l'angle d'incidence 30° et la position angulaire du bras soutenant le détecteur était variée, de sorte que le faisceau laser balaie la largeur du détecteur. Un modèle gaussien était ensuite appliqué aux mesures prises sur le détecteur afin d'en retirer les paramètres optimaux d'alignement du laser avec le centre du détecteur. La routine de

calibration générait ensuite des facteurs correctifs de décalage à appliquer aux angles indiqués par le contrôleur des moteurs.

3.2.3 L'algorithme d'analyse

Comme décrit à la section 2.6, plusieurs méthodes permettent l'analyse des résultats SPR en localisant l'angle de couplage aux plasmons de surface. L'algorithme implémenté a été la ligne de base dynamique, puisqu'il demeure simple d'emploi et présente une meilleure immunité au bruit que les méthodes centroïde et polynomiale employées seules. La modélisation paramétrique permet de retirer des informations additionnelles des mesures, mais son emploi est plus complexe et n'a jusqu'à présent pas été implémenté sur des systèmes à interrogation angulaire. L'algorithme de ligne de base dynamique a donc été implémenté sous MATLAB, permettant ainsi de localiser automatiquement le minimum de réflectance des courbes SPR obtenues. L'algorithme sélectionnait les valeurs de la courbe SPR sous la ligne de base dynamique et les modélisait par un polynôme d'ordre 8. L'angle de couplage aux plasmons de surface pouvait ensuite être obtenu par le minimum du polynôme. La figure 3.10 montre un exemple de l'application de l'algorithme sur un substrat d'or dans l'eau déionisée.

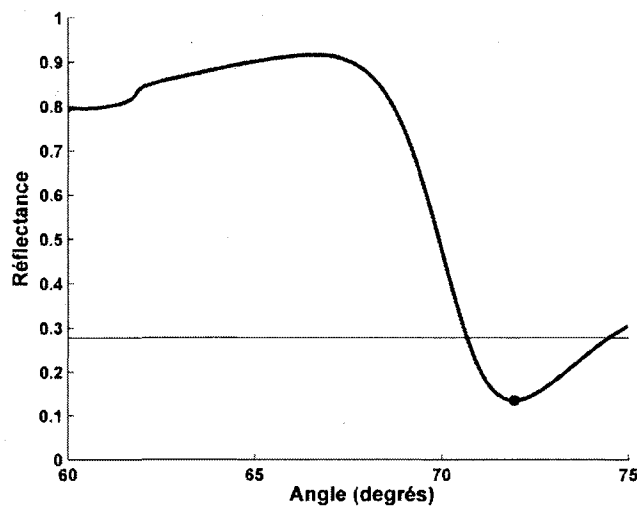


Figure 3.10 : Exemple de l'application de l'algorithme de ligne de base dynamique appliqué sur un balayage angulaire sur substrat d'or dans l'eau déionisée

Cet algorithme a donc été employé pour analyser les résultats et caractériser le système.

3.3 La caractérisation du système

3.3.1 Fidélité des mesures

Pour évaluer la fidélité des mesures, une succession de 15 balayages angulaires sur substrat d'or recouvert de silice a été réalisée dans de l'eau déionisée. L'angle de couplage aux plasmons de surface de chaque résultat individuel a ensuite été évalué avec l'algorithme de ligne de base dynamique. La moyenne des 15 angles calculés était $71,9510^\circ$ avec une déviation standard de $0,0030^\circ$. Les angles minimum et maximum mesurés étant respectivement $71,946^\circ$ et $71,958^\circ$, la fidélité sur la mesure est donc $F = \pm 0,006^\circ$.

Ensuite, afin d'évaluer la fidélité de la routine de calibration de l'appareil, un balayage angulaire après une calibration a été réalisé 9 fois pour un substrat d'or recouvert de silice dans de l'eau déionisée. L'angle de couplage a de nouveau été évalué individuellement à l'aide de l'algorithme de ligne de base dynamique. La moyenne des 10 angles calculés était $71,9652^\circ$ avec une déviation standard de $0,0155^\circ$. Les angles minimum et maximum mesurés étant respectivement $71,945^\circ$ et $71,989^\circ$, la fidélité sur la calibration est donc $F = \pm 0,022^\circ$.

3.3.2 Sensibilité du système

Pour caractériser le système au niveau de la sensibilité, des solutions à indices de réfraction connus ont été employées. La figure 3.11 montre les balayages angulaires sur substrat de 3nm chrome et 48nm or pour des solutions d'indices de réfraction variant entre 1.3325 et 1.3475.

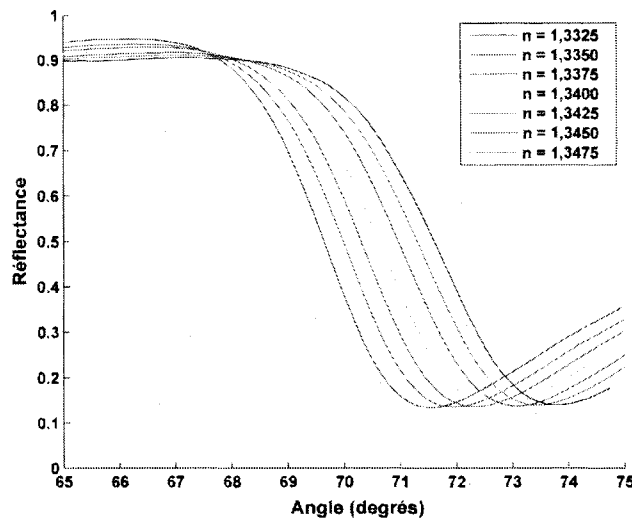


Figure 3.11 : Balayages angulaires sur substrat d'or pour des solutions d'indices de réfraction donnés

On remarque que l'angle de couplage augmente proportionnellement avec l'indice de réfraction du liquide employé.

Pour identifier la relation liant l'angle de couplage à l'indice de réfraction, l'algorithme de la ligne de base dynamique a été appliqué sur chacune de ces courbes. La relation linéaire obtenue pour l'angle de couplage en fonction de l'indice de réfraction du milieu peut être visualisée sur la figure 3.12.

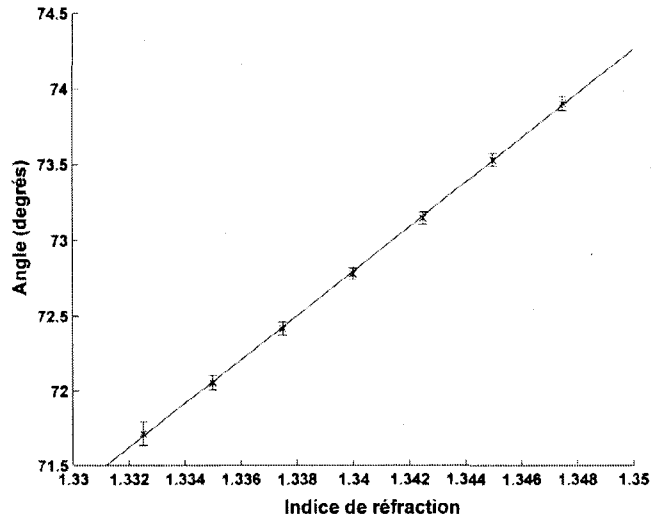


Figure 3.12 : Relation liant l'angle de couplage optimal et l'indice de réfraction du milieu

Un modèle linéaire a été appliqué aux résultats obtenus, en l'optimisant par la méthode des moindres carrés. L'équation du modèle obtenu est la suivante :

$$\theta_{sp} = 146,57n - 123,61 \quad (3-1)$$

À partir de ce modèle, il est possible de déterminer la sensibilité du système, mesurée comme étant une variation de 146,57 degrés pour une variation unitaire de l'indice de réfraction. Il est à noter que cette valeur de sensibilité n'est valable que pour les variations d'indice de réfraction avoisinant l'indice de l'eau.

Ensuite, pour caractériser la sensibilité de la détection du suivi de puissance à angle fixe, la réflectance des balayages angulaires obtenus précédemment a été évaluée à un angle se situant dans la région linéaire de la réponse SPR, soit l'angle 71°. Il est à noter que cet angle d'observation se situe dans cette région linéaire que pour les indices entre 1,3350 et 1,3450. La relation reliant la variation de réflectance, en RVU, à l'indice de réfraction peut être retrouvée à la figure 3.13.

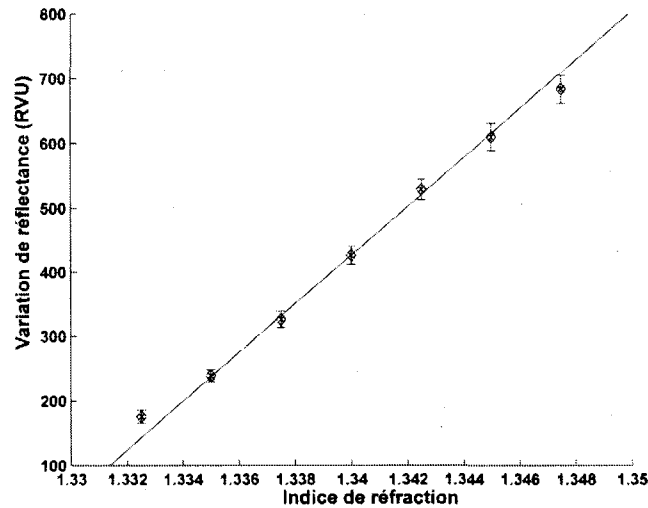


Figure 3.13 : Relation liant la variation de réflectance à l'indice de réfraction, à l'angle 71°

Un modèle linéaire a ensuite été appliqué aux valeurs obtenues, en l'optimisant par la méthode des moindres carrés. L'équation du modèle obtenu est la suivante :

$$R = 37774n - 50191 \quad (3-2)$$

Où R représente la réflectance telle que mesurée à l'angle 71°. Il est ainsi possible d'obtenir la sensibilité de la détection de puissance à angle fixe, donnée comme étant une variation de 37774 RVU pour une variation unitaire de l'indice de réfraction.

3.3.3 Plage dynamique

Le goniomètre permettait d'effectuer un balayage entre les angles 40° et 75°. Le système a été testé dans l'air avec un angle de couplage de 43,857°, associé à un indice de réfraction approximé à l'unité ($n \sim 1$), jusqu'à un angle de couplage de 73.905°, associé à un indice connu $n = 1,3475$. La plage dynamique de détection s'étend donc entre ces deux valeurs d'indice de réfraction. Pour la plage de linéarité, il est important de préciser que la sensibilité calculée à la section 3.3.3 ne s'applique que pour les variations d'indice de réfraction avoisinant l'indice de l'eau, où la sensibilité est linéaire. Une vérification à l'aide de liquides d'indices de réfraction connus distribués sur toute la plage dynamique de l'appareil n'a pas été réalisée, mais permettrait d'évaluer la sensibilité et la linéarité du système sur la totalité de cette plage.

Pour la mesure de puissance à angle fixe, comme décrit à la section 3.3.2, la plage dynamique est limitée à la région linéaire de la réponse SPR, permettant de mesurer une variation maximale d'indice de réfraction de 0,01 RIU.

3.3.4 Résolution

À la section 3.3.2, la fidélité sur une mesure d'angle a été définie comme étant $\pm 0,006^\circ$. Une variation de l'angle de couplage mesuré supérieure à cette valeur représente donc la limite de détection du système. Si on réarrange l'équation de la sensibilité de la détection angulaire obtenue à la section 3.3.3, on obtient la relation suivante entre l'indice de réfraction et l'angle de couplage SPR :

$$\Delta n = \frac{\Delta \theta_{sp}}{146,57} \quad (3-3)$$

De cette relation, il est facile d'obtenir la résolution de cette détection, c'est-à-dire la variation minimale d'indice de réfraction mesurable associée à un changement d'angle θ_{sp} de 0,007. La limite de détection du système est donc $4,8 \times 10^{-5}$ RIU.

Pour la mesure de puissance à angle fixe, le bruit sur une mesure est inférieur à 1 RVU. En prenant cette valeur comme étant le plus petit incrément mesurable, il est possible d'obtenir la résolution de cette technique de détection. Si on réarrange l'équation de la sensibilité de la détection de puissance à angle fixe obtenue à la section 3.3.3, on obtient la relation suivante entre l'indice de réfraction et la réflectance mesurée:

$$\Delta n = \frac{\Delta R}{37774} \quad (3-4)$$

La résolution de cette technique de détection, soit la variation minimale d'indice de réfraction mesurable associée à une variation de réflectance de 1 RVU, peut ensuite être obtenue. La limite de détection est donc $2,7 \times 10^{-5}$ RIU.

3.3.5 Résumé des caractéristiques techniques

Le tableau 2 présente un résumé technique du système conçu, de même qu'une comparaison avec un système commercial, le Biacore 3000. Les spécifications actuelles de ce système ont été obtenues directement du site Internet de l'entreprise [*Biacore 3000 Product Brochure*, 2003].

Tableau 3.1 : Résumé des spécifications techniques du système conçu et comparaison avec un système commercial

	SPR Université de Sherbrooke		Biacore 3000
	Détection angulaire	Angle fixé	
Fidélité	0,006°	-	-
Fidélité de calibration	0,022°	-	-
Plage dynamique	1 - 1,3475	0,01 RIU	1,33 - 1,4
Limite de détection (En RIU)	$4,8 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-5}$	1×10^{-5}
Compatibilité chimique	Très Forte		Faible
Contrôle fluidique	Non		Oui
Nombre de canaux	1		4
Coût estimé (US\$)	22 000		200 000

À noter que les spécifications de fidélité et de fidélité de calibration ne sont pertinentes que pour la détection angulaire de notre système. On remarque que le système conçu à l'Université de Sherbrooke présente une sensibilité comparable au Biacore 3000, pour une fraction du coût. De plus, notre système est plus flexible et permet l'emploi de solvants, de bases et d'acides puissants grâce à sa très forte compatibilité chimique. Cependant, le Biacore 3000 est équipé d'un contrôle fluidique et permet de réaliser une détection simultanée sur 4 canaux, permettant l'emploi de canaux de référence pour diminuer le bruit sur la mesure. Dans un souci d'amélioration, il pourrait être intéressant de modifier le système actuel pour y intégrer ces mêmes caractéristiques.

3.3.6 Caractérisation d'une réaction biomoléculaire

L'appareil a ensuite pu être employé par des chimistes de la Faculté de Médecine et des Sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke : une candidate en stage postdoctoral Ewa Wieczerszak et un candidat aux études doctorales Raymond jr Hamel. Ils ont démontré la

faisabilité d'employer la résonance des plasmons de surface pour effectuer le suivi d'une réaction de ligation chimique native (NCL). Ils ont de plus déterminé la cinétique de la réaction sur le substrat SPR. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Biopolymers* [WIECZERZAK et coll., 2008].

La NCL est une méthode de synthèse chimique employée pour de larges peptides et des protéines entières [DAWSON et coll., 1994]. Dans ce cas-ci, la ligation chimique native d'un thioester de bradykinine sur une cystéine était catalysée par l'acide 4-mercaptophénylacétique (MPAA). La figure 3.14 illustre le schéma réactionnel de cette ligation chimique à suivre à l'aide de la SPR.

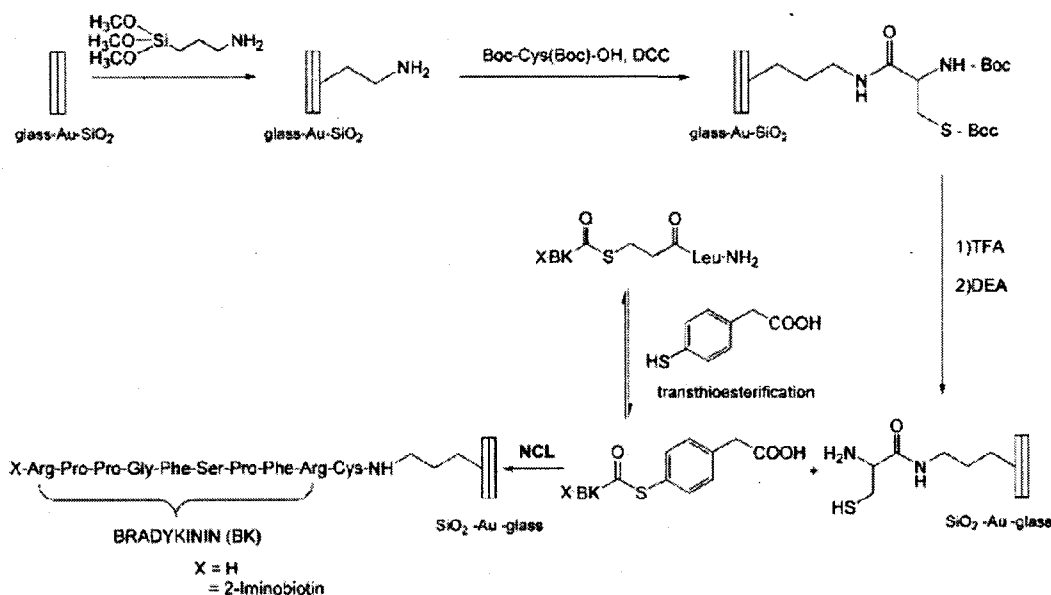


Figure 3.14 : Schéma réactionnel de la ligation chimique native d'une bradykinine modifiée [WIECZERZAK et coll., 2008]

La réaction a été effectuée sur des substrats d'or recouverts de silice tels que décrits à la section 3.1.3. La première étape consistait à fonctionnaliser chimiquement le substrat par une couche d'aminosilane (APTES). Ensuite, sur le silane était attachée une cystéine protégée par deux groupements BOC. Puis, la troisième étape consistait à cliver les BOC pour libérer le groupement amine et thiol de la cystéine en milieu acide. Finalement, la bradykinine modifiée était attachée à la cystéine par NCL et cette réaction était suivie en temps réel sur le système

SPR. La figure 3.15 présente une vue élargie sur le minimum des balayages angulaires effectués après chacune de ces étapes.

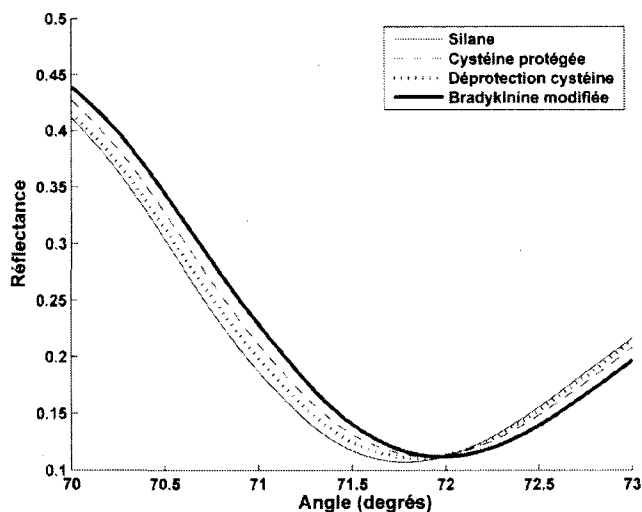


Figure 3.15 : Vue élargie centrée sur le minimum pour des balayages angulaires effectués après chaque étape pour la réaction NCL

La courbe à gauche indique l'état initial du système, où l'on retrouve une couche d'aminosilane sur le substrat (courbe —). L'ajout de la cystéine protégée implique un ajout de masse à la surface, expliquant le déplacement de l'angle de couplage vers la droite (courbe ---). Pour procéder à la NCL, les sites réactifs doivent d'abord être déprotégés. Cette étape se traduit par une diminution de l'angle de couplage, puisque une proportion de la masse liée au substrat est libérée (courbe ···). Enfin, il est possible de procéder à la réaction de NCL. L'attachement de la bradykinine à la surface provoque un déplacement de l'angle de couplage vers la droite (courbe —). L'importance de cette dernière variation, comparée aux premiers déplacements, réside dans la large masse molaire du thioester de bradykinine, plus importante que la cystéine par exemple. Une large variation de masse à proximité du substrat implique un plus grand déplacement de l'angle de couplage SPR.

La figure 3.16 présente le suivi par SPR de la NCL pour différentes concentrations du catalyseur MPAA, démontrant la possibilité d'employer le système développé pour évaluer des interactions biomoléculaires sur la surface des substrats.

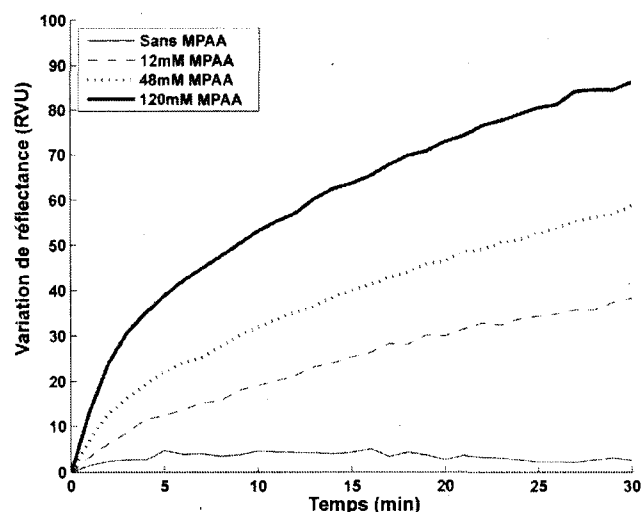


Figure 3.16 : Suivi SPR à angle fixe pour différentes concentrations de catalyseur pour la réaction de NCL

3.3.7 Caractérisation de l'origine de la réponse SPR de cellules vivantes

Le système a ensuite pu être employé par un troisième étudiant, Charles M. Cuerrier, candidat au doctorat en pharmacologie à la Faculté de Médecine et des Sciences de la santé. Le système a ici été utilisé pour évaluer l'origine de la réponse SPR obtenue suite à la stimulation des cellules avec l'angiotensine II. Pour ce faire, les cellules ont été incubées sur les substrats SPR jusqu'à l'atteinte d'une monocouche confluente. Les différentes voies de signalisation menant à l'activation cellulaire ont été évaluées afin de déterminer l'origine de la réponse SPR et ce, à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques. Les contributions de la mobilisation du calcium intracellulaire et de la réorganisation du cytosquelette d'actine ont aussi été analysées par différentes méthodes de microscopie. Ces résultats font l'objet d'un article soumis par M. Cuerrier à la revue *Experimental Cell Research*, intitulé "Surface plasmon resonance as a tool to measure cell-cell cohesion and epithelial integrity".

4 MESURE D'ACTIVITÉ CELLULAIRE PAR RÉSONANCE DES PLASMONS DE SURFACE

L'essentiel de ce chapitre est constitué d'un article qui, au moment du dépôt final de ce mémoire, était soumis à la revue *Biosensors and Bioelectronics*. Cet article, intitulé "Biosensing using surface plasmon resonance and living cells", inclut les contributions des auteurs suivants : Vincent Chabot, Charles M. Cuerrier, Emanuel Escher, Vincent Aimez, Michel Grandbois et Paul G. Charette.

La combinaison de la résonance des plasmons de surface avec une monocouche de cellules vivantes est proposée ici comme méthode de biodétection. La technique est basée sur l'hypothèse que l'activité cellulaire induite par des agents externes est souvent associée à un changement morphologique de la cellule, ce qui devrait à son tour mener à une variation de l'indice de réfraction effectif à l'interface entre la membrane cellulaire et la couche métallique.

Le signal SPR originaire d'une surface d'or recouverte de cellules a été enregistré pour une période de 30 minutes après l'injection de plusieurs agents reconnus pour leur influence sur les changements morphologiques et l'activité des cellules. Spécifiquement, la réponse à trois types de stimulation a été évaluée, soit la réponse à une endotoxine avec les lipopolysaccharides, à une toxine chimique avec l'azoture de sodium et à un agoniste physiologique avec la thrombine.

La comparaison avec des images obtenues en microscopie à contraste de phase révèle que la variation du signal SPR peut être associée à l'induction de la mort cellulaire pour le traitement aux lipopolysaccharides et à une contraction du corps cellulaire dans le cas de l'azoture de sodium. La réponse à la thrombine est toutefois plus complexe, démontrant une chute rapide de la réflectance mesurée sur une période de 5 minutes suivie par un retour à la valeur originale. Pour ce traitement, la séquence temporelle observée en microscopie à contraste de phase indique que la première phase de la variation SPR est reliée à la contraction cellulaire et

à une augmentation des espaces intercellulaires. Quant à la phase de recouvrement, elle peut être associée à un étalement cellulaire sur le substrat. Le signal SPR est donc consistant avec la réponse cellulaire observée pour les traitements décrits. Ceci confirme la validité du biocapteur et suggère son emploi pour le suivi d'une grande variété de réponses cellulaires impliquant un remodelage morphologique.

INTRODUCTION

Environmental and biomedical research are pushing towards the development of biosensors able to rapidly monitor the biological activity of molecules, such as toxins, chemicals or agonists. Most of the research in these fields is in the development of specific biosensors, where the detector surface is functionalized in order to detect the presence of a specific target molecule [MALHOTRA et coll., 2003]. However, there is a need for broad-range biosensors, where the focus is to detect molecules involved in a wide variety of biological responses [BOUSSE, 1996]. In this branch of sensing lies the concept of a living cell biosensor, where the definition of the sensor is extended to include a living cell population as the sensing element [PANCRAZIO et coll., 1999]. The cells therefore act as reporters of their environment, where the detection method must register the cellular signals.

Living cell sensing is already the subject of extensive research and many non-optical sensing methods allow the measurement of cellular metabolism, such as electrochemical sensors and light-addressable potentiometric sensors [YOTTER et coll., 2004b, XU et coll., 2005]. The concept of a biosensor, based on cells as the sensing elements to monitor toxicity and cell metabolism, has already been demonstrated using electric cell-substrate impedance sensing [KEESE et coll., 1994, ARNDT et coll., 2004]. Optical sensing methods, such as nanoprobe and fluorescence microscopy, are also extensively applied to monitor living cell activity [KRISHNAN et coll., 2001, VO-DINH et coll., 2006]. Among the optical detection methods for living cell sensing, surface plasmon resonance (SPR) is one of the most promising candidates for non-invasive detection assays because it does not require labelling agents [YOTTER et coll., 2004a]. Here, we demonstrate that SPR can be combined with living cells to monitor the effect of different molecular stimuli on cellular activity.

A surface plasmon is a charge-density oscillation occurring at the interface between a metal such as gold or silver and a dielectric [HOMOLA et coll., 1999b]. The following equation defines the wave vector of a surface plasmon wave (K_{sp}):

$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}} \quad (1)$$

where ω is the angular frequency, c the speed of light, and ϵ_M and ϵ_D the respective metal and dielectric (sensing medium) permittivity. This equation defines a surface plasmon when the real part of ϵ_M is negative and its absolute value is greater than ϵ_D [HOMOLA, 2003].

In order to match the wavevectors of the incident light and the surface plasmons, as required for surface plasmon resonance, a coupling method (prism or grating) must be used [ZAYATS et coll., 2003]. In the Kretschmann geometry, a p-polarized laser beam is reflected on the sample through a high refractive index prism at an angle superior to the angle of total internal reflection (Fig.1a). The reflection at the metal-dielectric interface creates an evanescent field in both the metal and the dielectric [HOMOLA, 2006]. This exponentially decaying field is strongly attenuated in the metal, but propagates a greater distance (~ 200 nm) into the dielectric (sensing medium). The evanescent field has the following wave vector (K_{ev}) equation:

$$K_{ev} = \frac{\omega}{c} n_p \sin \theta \quad (2)$$

where n_p is the refractive index of the prism and θ the angle of incidence. Optimal coupling between light and plasmons occurs when the momentum conditions match, giving:

$$\theta_{sp} = \sin^{-1} \left(\frac{1}{n_p} \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}} \right) \quad (3)$$

Therefore, we see that coupling into the surface plasmons occurs at specific conditions of incidence angle, laser wavelength and sensing medium refractive index. A modification of the sensing medium refractive index, for example caused by the adhesion of biomolecules on the surface, will change these conditions for maximum coupling. This coupling appears as a sharp dip in the measured laser reflectance as a function of incident angle (Fig.1b).

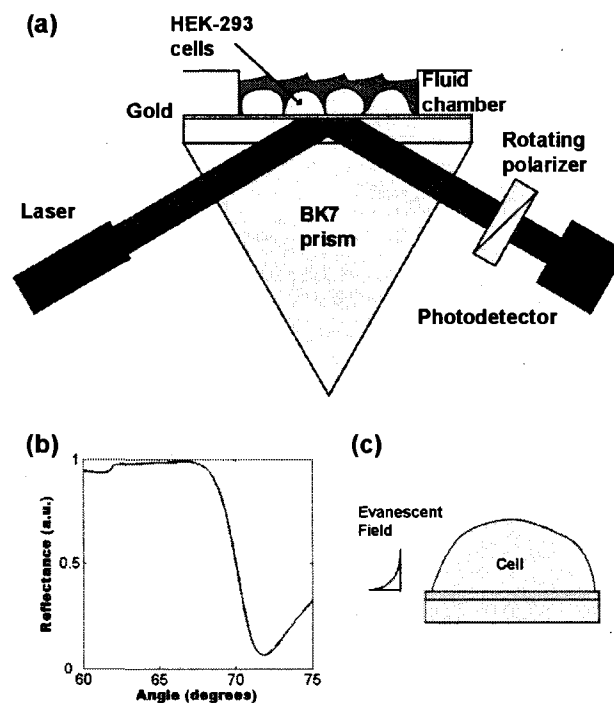


Figure 1: (a) Schematic representation of the surface plasmon resonance apparatus. A laser is incident on the gold-coated sample and the reflectance is monitored by a photodetector. A rotating polarizer allows the use of the s-polarization, unaffected by the surface plasmon, to normalize and decrease noise values. (b) Typical SPR angular scan (c) The evanescent field created by the surface plasmon resonance only allows monitoring of events occurring at the basal level of the cell (~200nm).

Recently, SPR has been applied to the real-time monitoring of living cells to probe molecular processes [HIDE et coll., 2002, YANASE et coll., 2007]. It has also been used to detect blood coagulation and platelet adhesion under physiological flow conditions [HANSSON et coll., 2007]. Infrared SPR has also been used to monitor the enrichment and depletion of cholesterol in the cell plasma membrane [ZIBLAT et coll., 2006]. Changes in cellular morphology, observed through microscopy techniques, are often used as a simple mean to evaluate cellular activity following specific activation [GIULIANO et coll., 2003, TENCZA et coll., 2004, BUTCHER, 2005]. These techniques are ultimately limited by the capacity to discriminate changes observed at typical microscopic resolutions. Since cellular activation often results in morphology changes such as cell contraction and spreading, it should affect the basal portion of the cell, which lies within the evanescent field of the surface plasmon (Fig.1c). Therefore,

surface plasmon resonance is an excellent candidate for the real-time monitoring of cellular activation involving morphological remodelling.

In this study, we monitored living cells grown on SPR sensing surfaces following injection of various molecular stimuli. First, we used a bacterial endotoxin, lipopolysaccharides (LPS), known to cause important cellular response often leading to cell death [HEUMANN et coll., 2002]. To evaluate sensitivity to activation by a chemical agent, we injected sodium azide, a chemical toxin known to prevent cellular respiration by inhibiting the cytochrome c oxidase-respiratory chain complex IV [LEARY et coll., 2002, ISHIKAWA et coll., 2006]. Finally, to demonstrate the SPR response to specific pharmacological activation, we used thrombin, which is a physiological agonist involved in the modulation of cell layer integrity [BOGATCHEVA et coll., 2002, COUGHLIN, 2005].

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human embryonic kidney-293 (HEK-293) cells (Qbiogene Carlsbad, CA, USA, QBI-HEK-293A cells) were maintained in Dulbecco's Modification Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2mM L-glutamine, 2.5µg/ml amphotericin B, 50IU/ml penicillin and 50µg/ml streptomycin (Wisent, St-Bruno, Qc, Canada) at 37°C in 5% CO₂ incubator. Prior to the experiments, the cells were plated on a SPR glass-gold surface in a 60 mm Petri dish and left to grow to confluence. The cell culture medium was then washed once and replaced with HEPES-Buffered Salt Solution (HBSS) consisting of 20mM Hepes at pH 7.4, 120mM NaCl, 5.3mM KCl, 0.8mM MgSO₄, 1.8mM CaCl₂, and 11.1mM dextrose. HEK-293 cells were respectively stimulated with various concentrations of lipopolysaccharides (5µg/ml to 5mg/ml) from *Escherichia coli*, 6.5mg/ml sodium azide and 2U/ml thrombin (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada).

Surface plasmon resonance substrates

Standard glass microscope slides were used as base substrates. Prior to metal deposition, the glass slides were cleaned in piranha solution to remove any contaminants; afterwards they

were placed under vacuum for metal deposition (BOC Edwards evaporator, model: AUTO 306). A chromium adhesion layer (3nm) and a gold layer (48nm) were deposited subsequently without breaking vacuum between evaporation. Prior to cell culture, the gold surfaces were coated with poly-L-lysine (Sigma, Oakville, ON) to ensure good cellular adhesion.

Surface plasmon resonance apparatus

The analysis was performed at room temperature on a custom-built surface plasmon resonance apparatus. The substrate is placed on top of a BK7 ($n = 1.515$ at 635nm) coupling prism (Melles Griot, USA) with a layer of refractive index matching fluid (Cargille Laboratories, New Jersey). A 4 mW stabilized laser diode centered at a wavelength of 635 nm (Thorlabs, Inc., USA) is reflected off the gold surface and passed through a motorized linear polarizer. As only the p-polarization is coupled into the surface plasmons, the s-polarization is used as a reference to remove the dependence on laser power drift and other time-dependant noise sources. The intensity of the polarized laser beam is measured with a biased photodetector (Thorlabs, Inc., USA) and the signal is acquired and processed in a custom-developed LabVIEW control interface program. Reflectance as a function of angle was measured before each experiment (Fig.1b). A fixed angle was then selected in the quasi-linear region of the SPR response and reflectance as a function of time was monitored. Data were treated to remove instantaneous refractive index changes caused by injection of the stimulating agent. Results are given in reflectance variation units (RVU), where 1 RVU represents 0.1% variation in total reflectance.

Phase contrast microscopy

Micrographs of the cell morphology changes were obtained using an inverted fluorescence microscope (AxioVert 200, Carl Zeiss, Germany) equipped with a phase-contrast system. All images were captured with a 40X phase-contrast objective, a high sensitivity camera (AxioCam MRm, Carl Zeiss, Germany) and analyzed with AxioVision LE software.

Statistics

Data are shown as mean value \pm standard error of the mean (s.e.m.). To determine significance of differences ($p < 0.05$), we used an analysis of variance (ANOVA) between the

groups and a post-hoc test with the Dunnett procedure to compare each mean with the control group.

RESULTS

To show that SPR can be applied to the monitoring of cell morphology remodeling, we first stimulated the cells with lipopolysaccharides (LPS). Figure 2a shows two typical SPR angular scans of a confluent HEK-293 cell monolayer, taken before (○) and after a 30 min stimulation (✕) of 5mg/ml LPS. The quasi-linear region of the reflectance curve, between 71° and 74°, is displaced to lower angles after stimulation. As shown in Figure 2b, at a fixed angle of 72°, the normalized reflectance (the ratio of orthogonal polarizations) goes from 0.625 to 0.457 after 30 min of LPS stimulation, an indication that SPR is sensitive to cell changes occurring as a result of their stimulation by LPS.

To evaluate the sensitivity of the method to a variation in stimulus concentration, we injected varying amounts of LPS. Figure 2c shows the average SPR responses ($n = 3$ or 4) of HEK-293 cells stimulated by injecting 5µg/ml, 50µg/ml, 500µg/ml, 2mg and 5mg/ml of LPS. The results show that an increase in LPS concentration leads to an increase in the magnitude and slope of the measured SPR response.

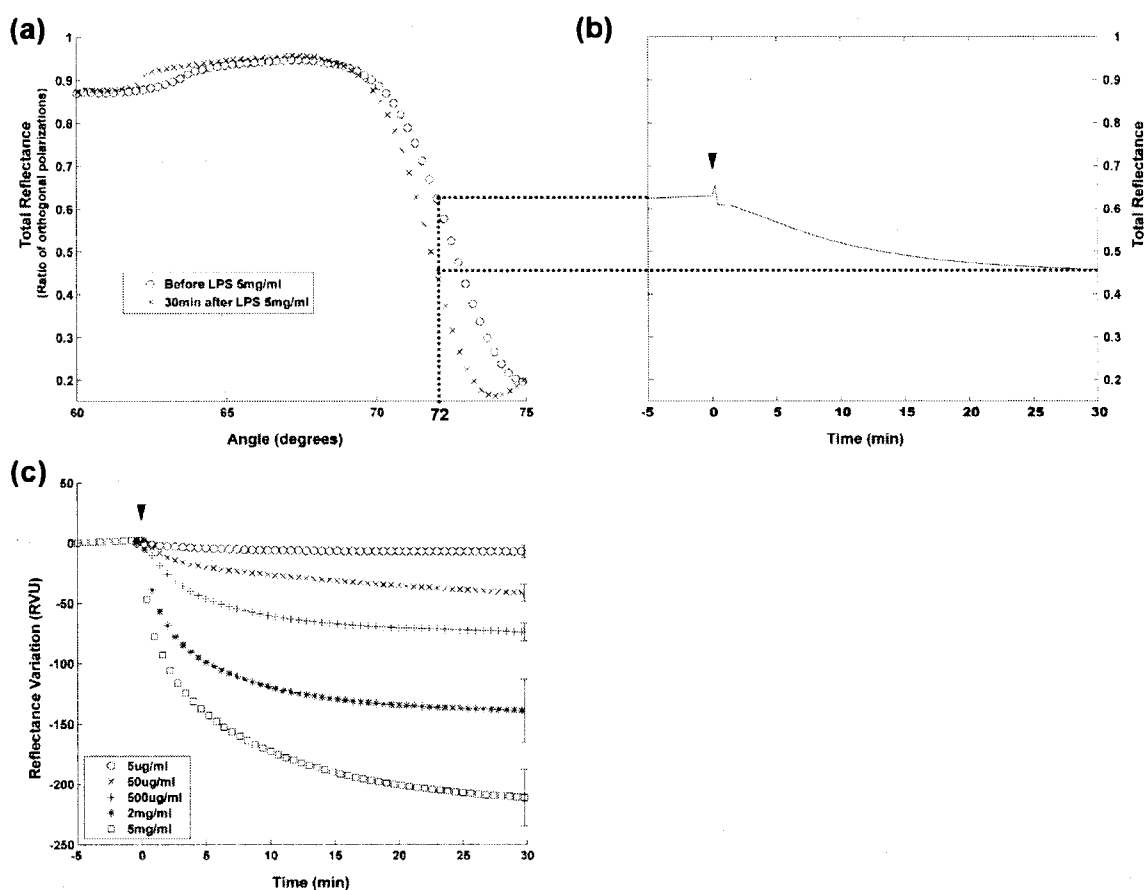


Figure 2: (a) Angular scans of a HEK-293 cell monolayer taken before (○) and after 30min (×) of the injection of 5mg/ml lipopolysaccharides. (b) Corresponding reflectance measurements taken for a fixed angle, 72°, over the 30min period. (c) Average reflectance variations ($n = 3$ to 4) of cellular response following stimulation by 5μg/ml, 50μg/ml, 500μg/ml, 2mg/ml and 5mg/ml lipopolysaccharides. Error bars are presented on the last plotted point.

In Figure 3, we compared the SPR response obtained through the stimulation of cells with three distinct well-known biomolecular and chemical agents. A comparison of the SPR signals with phase contrast micrographs taken before and at different time intervals after the stimulation was used to confirm and clarify the morphological origin of the SPR signal variations. As a negative control, to address the possibility of SPR response changes being solely induced by the addition of liquid and/or temperature changes in the fluid chamber or an indirect cellular stimulation by shear stress, we stimulated the cells with only the HBSS solution. As expected, no significant variation in the SPR signal was observed after the

injection of HBSS (Fig.3a). This result was also confirmed by phase contrast microscopy, which showed no detectable change in the cell morphology (Fig.3a: -5, 5 and 30 min).

Figure 3b shows the averaged SPR response ($n=4$) of HEK cells after stimulation with 500 μ g/ml LPS. The results show a rapid and large decrease in the measured laser reflectance over the duration of the experiment, for a total variation of -78 ± 8 RVU ($p<0.01$) 30 min after LPS injection. To determine if the measured reflectance variation is related to changes in cell morphology, we again compared the SPR measurements with phase contrast microscopy. As can be seen on the micrographs in Figure 3b, changes in cell morphology are already noticeable 5 min after LPS injection and particularly clear after 30 min, as indicated by the collapse of intracellular structure (See black arrows).

In Figure 3c, we present the averaged SPR monitoring ($n=3$) of cellular response induced by the cytotoxic agent sodium azide, after injecting a 6.5mg/ml concentration. We observed a decrease of the measured laser reflectance that reaches a constant plateau after ~ 15 min. The maximal reflectance change was measured to be -35 ± 6 RVU ($p<0.05$). Phase contrast microscopy showed an increase in the size of the intercellular space as a result of cell shrinkage (arrows in Fig.3c).

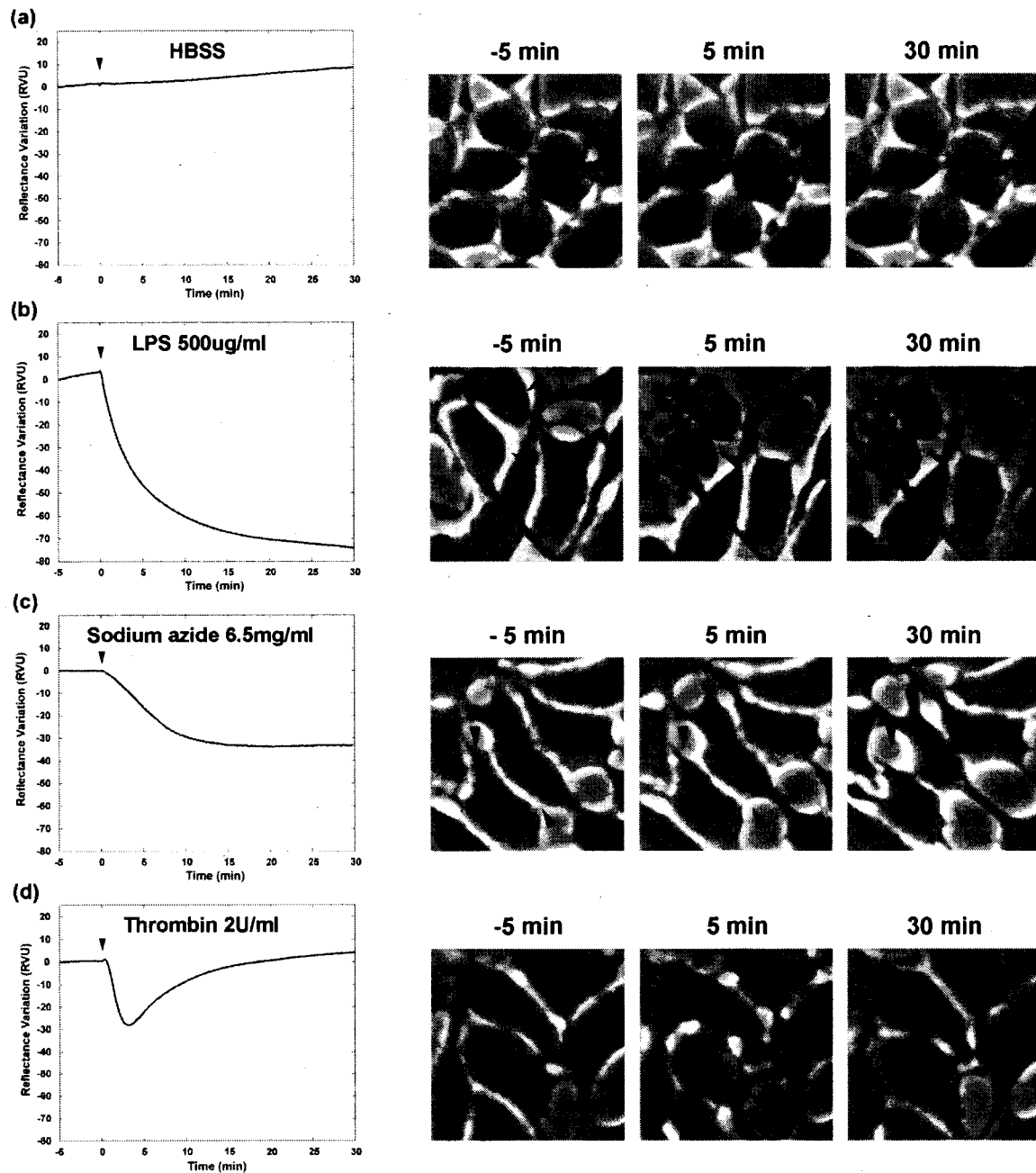


Figure 3: (Left) Average reflectance variations ($n = 3$ to 4) as a function of time of a HEK-293 cell monolayer after stimulation by the injection of (a) HBSS solution, (b) lipopolysaccharides $500\mu\text{g/ml}$, (c) sodium azide 6.5mg/ml and (d) thrombin 2U/ml . (Right) Phase contrast micrographs taken 5min before, 5min after and 30min after the injection of the described stimuli. Black arrows show morphological changes occurring as a result of the each stimulation.

Finally, we applied SPR to the monitoring of the specific activation of cells by the physiological agonist thrombin. The averaged monitoring (n=4) of SPR reflectance variations after injection of 2U/ml thrombin can be seen in Figure 3d. A biphasic response characterized by a maximal decrease in the signal equivalent to -30 ± 7 RVU ($p < 0.05$) immediately after stimulation is observed, followed by a slower recovery back to the baseline. As with previous experiments, this SPR signal variation is associated with morphology changes as observed in the phase contrast micrographs (arrows in Fig.3d). Indeed, 5 min after thrombin injection, a noticeable cell contraction can be observed together with an increase in the area of intercellular gaps. In addition, the slow recovery phase of the SPR signal is associated with a respreading of the cells as shown in the micrograph taken 30 min after stimulation.

Note that injection of a stimulating agent (LPS, sodium azide, thrombin) onto a bare gold surface (without cells) induces an increase of reflectance in the SPR signal (data not shown). On the contrary, adding the same agent at the same concentration, in presence of cells, leads to a decrease in reflectance.

DISCUSSION

Association of the SPR response with cell morphological changes confirmed by phase contrast microscopy shows that combining surface plasmon resonance with a confluent living cell monolayer can be used to form a broad-range biosensor that allows the monitoring of chemical or biological agents that induce morphological changes in the cells.

Lipopolysaccharide is an endotoxin affecting a living cell by the activation of its membrane receptor [RAETZ et coll., 2002]. LPS is strongly implicated in the inflammatory response induced by Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [HEUMANN et coll., 2002]. Tremendous efforts are deployed to develop new diagnostic methods to detect in real-time such infections in a clinical environment [LAZCKA et coll., 2007, MAALOUF et coll., 2007]. Many studies have already described the cellular effects of LPS on various cell types and have demonstrated that this agent induces cell death, associated with morphological changes such as cell rounding and membrane blebbing [ALIPRANTIS et

coll., 1999, CHAKRAVORTTY et coll., 2000]. Phase contrast microscopy shows the collapse of intracellular structure, an effect previously documented in cells treated with LPS [LIU et coll., 2005]. Those results demonstrate that SPR can monitor in real-time the effect of LPS on living cells. The concentration-dependency of the SPR response shows that the combination of SPR with living cells can be used as a toxicity biosensor in order to quantitatively assess the level of LPS toxin in an environment.

Sodium azide is a toxic chemical compound used for many purposes, such as a preservative for aqueous laboratory reagents as well as a gas-generating agent in automobile airbags [CHANG et coll., 2003]. This substance is noxious for human health and its presence in an increasing variety of products makes it a good candidate for toxicity detection in our system. At a cellular level, as observed in our phase contrast results, sodium azide is known to cause cell shrinkage, which is associated with cell death by the inhibition of cellular respiration [ISHIKAWA et coll., 2006]. Again, SPR response to this chemical agent shows that combining this detection technique with living cells performs well as a cytotoxicity biosensor. We can envision a self-sufficient module where the cells are exposed to the environment and which would generate an alert when sufficient amounts of toxins are detected, as previously demonstrated with electric cell-substrate impedance sensing [GILCHRIST et coll., 2001]. A portable biosensor based on this detection method could then be used to insure environment viability where chemicals like sodium azide are used.

Thrombin is a well-known agonist implicated in hemostasis and vascular endothelium permeability [ARNOUT et coll., 2006, KOMAROVA et coll., 2007]. The activation of protease activated receptors (PAR-1) by thrombin is well documented to lead to cell contraction [NOBE et coll., 2005]. The phase contrast microscopy images, showing cellular contraction, correlate well with the observed SPR response. In these micrographs, we observe an increase in the size of the intercellular gaps leading to the modulation of the cell layer permeability; this is a hallmark of the cell stimulation by thrombin [BOGATCHEVA et coll., 2002, COUGHLIN, 2005]. In our experiment, the decrease in the SPR signal is believed to be largely dependent upon the formation of these intercellular gaps. Noticeably, these gaps

induced by thrombin gradually disappear as seen by the cells returning to their initial shape. For this recovery phase, the evolution of the SPR signal is also in good correlation with the phase contrast micrograph.

As the cells have a higher refractive index than the surrounding liquid medium [BEUTHAN et coll., 1996], changes in cell surface adhesion and/or morphology result in a corresponding change in the effective index of refraction on the sensing surface overall by changing the proportion in which the cells and the HBSS solution affect the plasmon resonance. This in turn results in an observable SPR signal. Since the injection of a stimulating agent onto bare gold surfaces induces an increase in SPR reflectance and adding the same agent at the same concentration in the presence of cells leads to a decrease in reflectance, it is clear that the observed SPR reflectance changes are mainly due to cellular changes, while the surface adsorption of the agent does not have a significant effect. Moreover, we have shown that the system response is dependent upon the concentration of the injected stimulus and that a dose-response curve can be obtained. We have also shown that a biphasic cell response can be monitored, as demonstrated with thrombin in Figure 3d by a cell contraction followed by cell recovery.

CONCLUSION

Surface plasmon resonance has the capacity to determine adhesion and morphological changes in cellular activity in real-time following activation through various agents. The cell population is used as the sensing element and thus acts as a reporter of the cellular environment. This technique could be used for biosensing in environmental and health care applications to determine toxin presence and their corresponding cellular response, as well as in pharmacological studies to better understand cell signaling pathways or identify new pharmacological molecules. The main advantage of this type of biosensor is the possibility to detect in a label-free method a broad range of molecules involved in a wide variety of biological reactions, since a single cell can react to a broad range of toxins and molecules.

For the purpose of demonstration, we limited our study to one cell type. The technique could be applied to a large array of cell lines, including epithelial and endothelial cells, to broaden the range of the biosensor - the cell population would however need to be robust, stable, and firmly attached to the sensing surface. For generalized point-of-use biosensing, cell types that can resist harsh conditions, such as ambient temperature and a serum-deprived medium, would be used.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by funds from Canadian Institutes of Health Research (CIHR: M.G., E.E.), the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ: E.E.), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC: V.A., P.C., M.G.) and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT: V.A., P.C., M.G., E.E.).

CONCLUSION

Un système de biodétection basé sur la résonance des plasmons de surface a été conçu et réalisé. La technique de couplage sélectionnée consistait en l'emploi de la réflexion totale atténuée dans un prisme équilatéral. Tel que démontré, cette technique de couplage démontre une meilleure résolution que la seconde technique usuelle, le réseau de diffraction, et permet aussi de s'affranchir de la contrainte de fonctionner en milieu peu diffusant. Deux alternatives de détection peuvent être employées pour la mesure à partir du système, soit l'interrogation angulaire et le suivi à angle fixe. Comme il a été démontré, l'interrogation angulaire, lorsque combinée avec l'emploi d'une source d'excitation à longueur d'onde rouge, permet d'obtenir une excellente sensibilité, légèrement inférieure à l'interrogation de phase. Cette dernière méthode nécessite cependant du matériel plus complexe, diminuant ainsi sa facilité d'utilisation, une spécification posée lors de la conception du système. Le suivi de puissance à angle fixé, lorsque combiné à une normalisation de la réflectance à l'aide de la polarisation TE, permet d'obtenir une excellente stabilité et sensibilité, et permet de plus la déduction directe des cinétiques de réaction, sans nécessiter l'emploi d'un algorithme de localisation du minimum de réflectance.

Au niveau des substrats, il était possible de déposer de fines couches métalliques sur des lames conventionnelles de microscopie, représentant une alternative faible coût pour la fabrication. L'argent a été confirmé comme démontrant une meilleure sensibilité que l'or, puisqu'il présentait une courbe de couplage nettement plus étroite que ce dernier. Cependant, l'argent démontrait une faible stabilité aux acides et solvants et s'oxydait rapidement. Les tests subséquents ont donc été réalisés sur substrats d'or. Une couche de silice de faible épaisseur (5nm) a aussi pu être déposée sur des substrats d'or pour permettre la liaison de réactifs normalement employés sur le verre.

La cellule fluïdique conçue a permis l'utilisation du système avec des solvants, acides et bases puissants, puisque fabriquée en Teflon™. Tel que décrit, ce matériau démontre une forte hydrophobicité, ce qui limite sa réactivité, et offre une excellente résistance chimique. De

plus, cette cellule était fabriquée en une seule pièce et donc simple à installer sur un substrat. Le montage vertical du goniomètre facilitait l'utilisation de cette cellule pour ajouter et retirer les réactifs à l'étude sans nécessiter de pompe.

Les mesures du photodétecteur étaient normalisées grâce à la polarisation TE, augmentant la stabilité à plus long terme. Une routine de calibration permettait d'obtenir les paramètres optimaux d'alignement optique sous la forme d'un décalage à appliquer au logiciel de contrôle des moteurs. Cette calibration du système permettait donc une bonne reproductibilité des mesures. L'analyse des résultats de balayage angulaire était effectuée par un algorithme de ligne de base dynamique et une modélisation polynomiale d'ordre 8. Tel que démontré au chapitre 2, l'algorithme de la ligne de base dynamique permet de négliger les variations verticales dans la courbe de couplage et présente donc une plus grande immunité au bruit. La modélisation polynomiale à ordre élevé tient compte de l'asymétrie de la courbe de couplage, elle permettait donc d'obtenir une plus grande précision dans la détermination de l'angle de couplage.

Le système a été caractérisé sur plusieurs niveaux. L'erreur reliée à la fidélité a été évaluée à $\pm 0,006^\circ$ au niveau de la mesure. Des calibrations successives ont démontré une fidélité de $\pm 0,022^\circ$ sur la calibration. Le système démontre une sensibilité pour le balayage angulaire de $146,57^\circ/\text{RIU}$ aux indices de réfraction avoisinant celui de l'eau, ce qui représente un changement de l'angle de couplage de $146,57$ degrés pour une variation d'indice de réfraction unitaire. Le système permet une interrogation angulaire entre les angles 40° et 70° , fixant la plage dynamique du système à la mesure d'indices de réfraction situés entre 1 et 1,3475. Quant à la limite de détection, elle peut être estimée à $4,8 \times 10^{-5}$ RIU. Pour la sensibilité de la mesure de puissance à angle fixe, elle a été évaluée à $37774 \text{ RVU}/\text{RIU}$. Cette mesure permet d'évaluer des variations maximales d'indice de réfraction de 0,01 RIU, afin de conserver l'angle d'observation dans la région linéaire de la réponse SPR. La limite de détection est évaluée à $2,7 \times 10^{-5}$ RIU.

Le système de biodétection développé répond bien aux spécifications de conception énoncées à la section 1.4. En effet, il démontre une bonne sensibilité et une résolution comparable à un système commercial, par exemple le Biacore 3000 qui démontre une résolution de 10^{-5} RIU [Biacore 3000 Product Brochure, 2003]. Il inclut une routine de calibration assurant une bonne reproductibilité des mesures. Au niveau de la flexibilité, il permet l'emploi de substrats différents ou le remplacement de la source d'excitation, et permet aussi d'adapter la plage de détection pour différentes réactions moléculaires, notamment par la sélection de l'angle d'observation pour un suivi à angle fixe. Les substrats d'or, possiblement recouverts de silice, démontrent une bonne stabilité, assurant encore une fois la reproductibilité des mesures. Ils sont compatibles avec les techniques de stérilisation usuelles, permettant la croissance cellulaire à même le substrat. Une cellule fluide complètement étanche et résistante chimiquement permet l'exposition du substrat aux réactifs à l'étude. Puisque son matériau de fabrication limite l'adhésion des réactifs sur ses parois, la cellule est facilement nettoyable. Finalement, l'interface développée, le contrôle totalement automatisé et l'algorithme d'analyse rendent le système simple d'utilisation par du personnel technique de laboratoire.

Le système développé bénéficierait cependant de quelques améliorations. Notamment, il pourrait être intéressant de lui ajouter un contrôle actif de la température afin de l'isoler des fluctuations dues à la climatisation des locaux. Ce contrôleur thermique pourrait lui aussi communiquer avec l'interface utilisateur développée dans LabVIEW. Aussi, l'étude présente était limitée à l'emploi d'une lignée cellulaire stable à température ambiante. Un contrôleur thermique permettrait de s'approcher des conditions physiologiques, soit une température avoisinant 37° Celsius, et ainsi fonctionner avec une plus grande variété de lignées cellulaires.

La cellule fluide employée pour les études biomoléculaires pourrait elle aussi être modifiée de plusieurs façons. Tout d'abord, la séparation de la cellule en plusieurs canaux distincts et le remplacement du photodétecteur par une caméra permettraient d'effectuer des mesures de contrôle en conditions identiques aux réactions à l'étude. Ces canaux additionnels permettraient aussi de s'affranchir des variations de réponse causées par des effets parasites, telles des fluctuations de température ou une déviation de la puissance du laser, en soustrayant

un canal contrôle du canal à l'étude. Ensuite, il pourrait être intéressant d'ajouter un système de pompes permettant de remplir et vider la chambre des réactifs, avec un contrôle du débit à même l'interface utilisateur. Un tel système permettrait de s'assurer d'une concentration constante des réactifs employés et permettrait de continuer la mesure à travers une série de lavages du substrat. Les effets reliés au transport de masse, notamment la limitation dans la cinétique d'une réaction causée par la vitesse de diffusion, pourraient être potentiellement éliminés.

La présente étude démontre donc qu'il est possible d'employer une population de cellules comme rapporteur de l'environnement cellulaire et de mesurer la réponse de ces cellules grâce à la résonance des plasmons de surface. Lorsque combinée à une couche de cellules vivantes, il a été démontré que la SPR permet la mesure de l'activité cellulaire. Le signal SPR a pu être relié aux changements morphologiques observés en microscopie à contraste de phase. Trois types de stimulation ont été suivies en temps réel sur le système SPR développé, démontrant ainsi le potentiel de cette technique pour la détection d'une large gamme de réponses cellulaires impliquant un changement de morphologie.

Le système de biodétection conçu permet donc la mesure de l'activité cellulaire. Il pourrait potentiellement être employé pour des applications environnementales ou médicales afin d'évaluer la présence de toxines et leur effet sur des cellules. L'avantage principal de ce biocapteur consiste en la possibilité d'étudier une large gamme de molécules, impliquées dans une grande variété de réactions biologiques. Un tel système de biodétection pourrait permettre l'identification de nouveaux composés pharmacologiques actifs. Ce système pourrait aussi être employé pour l'étude de la cellule elle-même, afin d'éclaircir certains mécanismes cellulaires complexes, par exemple la perméabilité vasculaire.

APPENDICE 1 – ANALYSE MATHÉMATIQUE DE CINÉTIQUES

Les biocapteurs à base de résonance des plasmons de surface sont couramment employés afin de caractériser l'attachement de molécules. De plus, les cinétiques de ces réactions moléculaires peuvent être directement déduites des analyses SPR [GREEN et coll., 2000]. Ces données de cinétique sont importantes pour connaître précisément les constantes cinétiques, telle la constante d'association, pour une réaction donnée. Cette connaissance permet de déterminer l'effet d'un catalyseur, d'un inhibiteur ou de diverses conditions sur la vitesse d'une réaction.

L'adhésion non spécifique sur le substrat, définie comme étant l'adsorption sur une surface par des interactions d'attraction plus faibles, vient compliquer la tâche de déduction des cinétiques [BLAWAS et coll., 1998]. Ce problème survient dans un grand nombre d'études pharmacologiques et les résultats sont normalement traités en soustrayant la partie linéaire reliée à l'adhésion non spécifique [RANG et coll., 1999]. Un modèle simple de traitement a été conçu et appliqué à la déduction de la cinétique de liaison d'une bradykinine modifiée à une cystéine par voie de ligation chimique native catalysée par l'acide 4-mercaptophénylacétique (MPAA). Le schéma réactionnel pour cette ligation chimique peut être retrouvé sur la figure A28 dans la section 3.3.6.

La figure A1.1 montre un résultat typique du suivi de cette réaction par résonance des plasmons de surface. On remarque sur la figure que la réponse SPR démontre la présence d'une composante exponentielle couplée à une tendance linéaire. À l'opposé, le contrôle, obtenu par une ligation chimique native catalysée entre une bradykinine non modifiée et une cystéine réactive, démontre l'allure typique d'une adhésion non spécifique sur le substrat SPR. On remarque ici qu'il n'y a qu'une composante linéaire dans la réponse SPR mesurée. Ceci est justifié par la non spécificité de la réaction entre la bradykinine non modifiée et la cystéine.

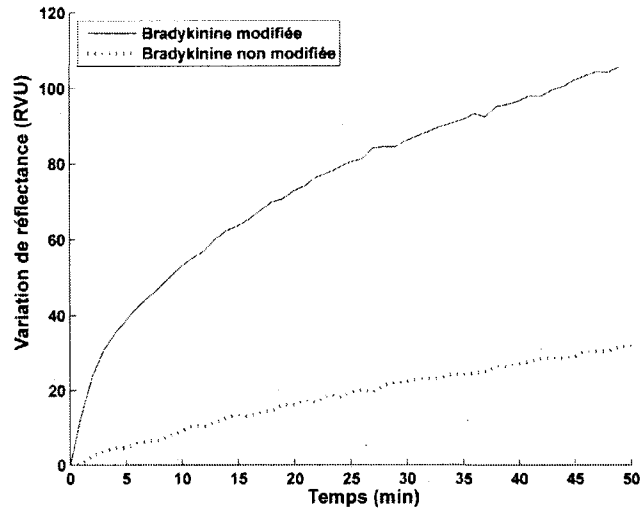


Figure A1.1 : Comparaison d'une réaction catalysée de ligation chimique native pour une bradykinine modifiée et une bradykinine non modifiée

Les courbes de cinétique de la réaction suivie par SPR ont donc été modélisées de façon non linéaire. Tel que vu précédemment, le modèle à appliquer aux données de la réaction consistait en une partie exponentielle, représentant la cinétique réelle de liaison obtenue, additionnée à une partie linéaire, représentant l'adhésion non spécifique sur le substrat. Le modèle est donc :

$$a_1 e^{-\frac{t}{\tau}} + a_2 t \quad (\text{A1-1})$$

Où a_1 et a_2 représentent des constantes, t le temps et τ la constante de temps de la réaction. La fonction de mérite définie pour l'optimisation consistait simplement en la somme du carré des erreurs entre le modèle et les données SPR. Les paramètres optimaux du modèle pouvaient ensuite être obtenus par la recherche itérative du minimum de la fonction de mérite. L'optimisation non linéaire sans contrainte a été réalisée dans le logiciel MATLAB à partir de la méthode simplex de Nelder-Mead (Nelder-Mead 1965). La méthode simplex Nelder-Mead est une méthode de recherche directe, ne faisant pas appel aux dérivées de la fonction de mérite [LAGARIAS et coll., 1998]. Elle est simple à implémenter et souvent la meilleure solution pour les problèmes d'optimisation ne demandant pas une forte puissance de calcul [PRESS et coll., 1992].

La figure A1.2 montre les paramètres obtenus en appliquant cette méthode d'optimisation sur une courbe SPR typique. Ce résultat a été obtenu après 416 itérations et 777 évaluations de la fonction de mérite, pour un minimum obtenu de 1.77077 à une tolérance de 10^{-10} . On peut aussi y voir la décomposition du modèle en ses deux composantes exponentielle et linéaire.

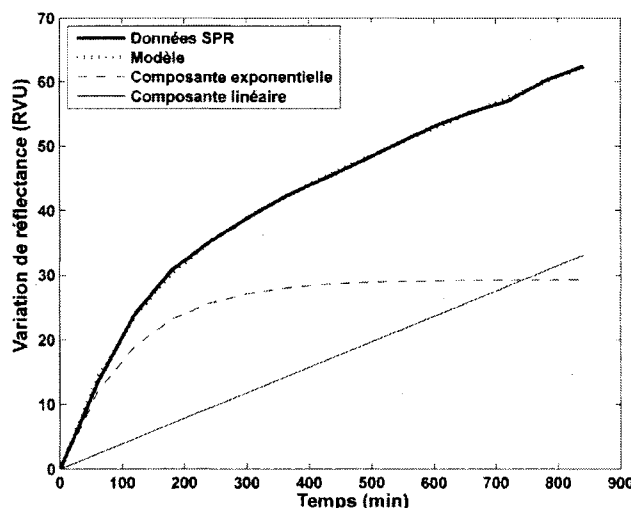


Figure A1.2 : Modélisation d'une courbe SPR typique de ligature chimique native catalysée

Chaque substrat SPR présentait un niveau de réactivité différent quant au nombre de sites d'attache disponibles, relié à la fonctionnalisation du substrat par la cystéine. Les résultats SPR ont donc dû être individuellement traités pour en extraire leur cinétique. Le temps nécessaire pour atteindre le maximum de liaison a pu être déterminé en normalisant chaque expérience par sa propre valeur maximale d'adhésion spécifique. La figure A1.3 démontre les cinétiques moyennes tirées de la modélisation individuelle des mesures de résonance des plasmons de surface, pour différentes concentrations du catalyseur MPAA.

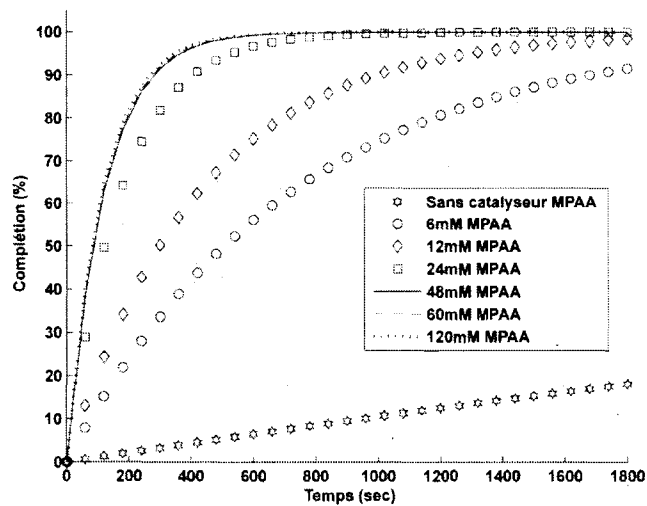


Figure A1.3 : Compilation des cinétiques de ligation chimique native pour différentes concentrations du catalyseur, obtenues par modélisation

Ces résultats ont pu faire l'objet d'une publication [WIECZERZAK et coll., 2008].

BIBLIOGRAPHIE

- ALIPRANTIS, A. O., YANG, R. B., MARK, M. R., SUGGETT, S., DEVAUX, B., RADOLF, J. D., KLIMPEL, G. R., GODOWSKI, P. et ZYCHLINSKY, A. (1999). "Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2", *Science*, vol. 285, n° 5428, p. 736-739.
- ARNDT, S., SEEBACH, J., PSATHAKI, K., GALLA, H. J. et WEGENER, J. (2004). "Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 19, n° 6, p. 583-594.
- ARNOUT, J., HOYLAERTS, M. F. et LIJNEN, H. R. (2006). "Haemostasis", *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol., n° 176 Pt 2, p. 1-41.
- BARNES, W. L. D., ALAIN & EBBESEN, THOMAS W. (2003). "Surface plasmon subwavelength optics", *Nature*, vol. 424, n° 6950, p. 824 - 830.
- BESENICAR, M., MACEK, P., LAKEY, J. H. et ANDERLUH, G. (2006). "Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions", *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 141, n° 1-2, p. 169-178.
- BEUTHAN, J., MINET, O., HELFMANN, J., HERRIG, M. et MULLER, G. (1996). "The spatial variation of the refractive index in biological cells", *Physics in Medicine and Biology*, vol. 41, n° 3, p. 369-382.
- Biacore 3000 Product Brochure*, Biacore Life Sciences, [en ligne], <http://www.biacore.com/lifesciences/index.html>, Consultation: 2008/05/19
- BLAWAS, A. S. et REICHERT, W. M. (1998). "Protein patterning", *Biomaterials*, vol. 19, n° 7-9, p. 595-609.
- BOGATCHEVA, N. V., GARCIA, J. G. et VERIN, A. D. (2002). "Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability", *Biochemistry (Moscow)*, vol. 67, n° 1, p. 75-84.
- BOUSSE, L. (1996) "Whole cell biosensors", *International Solid-State Sensors and Actuators Conference - TRANSDUCERS '95, 25-29 June 1995, Sensors and Actuators B (Chemical)*. Stockholm, Sweden, Elsevier, p. 270-275
- BUTCHER, E. C. (2005). "Can cell systems biology rescue drug discovery?" *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 4, n° 6, p. 461-467.
- CHAKRAVORTTY, D., KOIDE, N., KATO, Y., SUGIYAMA, T., KAWAI, M., FUKADA, M., YOSHIDA, T. et YOKOCHI, T. (2000). "Cytoskeletal alterations in lipopolysaccharide-induced bovine vascular endothelial cell injury and its prevention by sodium arsenite", *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 7, n° 2, p. 218-225.

- CHANG, S. et LAMM, S. H. (2003). "Human health effects of sodium azide exposure: a literature review and analysis", *International Journal of Toxicology*, vol. 22, n° 3, p. 175-186.
- CHINOWSKY, T. M., JUNG, L. S. et YEE, S. S. (1999). "Optimal linear data analysis for surface plasmon resonance biosensors", *Sensors and Actuators B (Chemical)*, vol. 54, n° 1-2, p. 89-97.
- COLLINGS, A. F. et CARUSO, F. (1997). "Biosensors: recent advances", *Reports on Progress in Physics*, vol. 60, n° 11, p. 1397-1445.
- COUGHLIN, S. R. (2005). "Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology", *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 3, n° 8, p. 1800-1814.
- DAWSON, P. E., MUIR, T. W., CLARK-LEWIS, I. et KENT, S. B. (1994). "Synthesis of proteins by native chemical ligation", *Science*, vol. 266, n° 5186, p. 776-779.
- DOSTALEK, J., VAISOCHEROVA, H. et HOMOLA, J. (2005). "Multichannel surface plasmon resonance biosensor with wavelength division multiplexing", *Sensors and Actuators B (Chemical)*, vol. 108, n° 1-2, p. 758-764.
- EKGASIT, S., THAMMACHAROEN, C., YU, F. et KNOLL, W. (2005). "Influence of the metal film thickness on the sensitivity of surface plasmon resonance biosensors", *Applied Spectroscopy*, vol. 59, n° 5, p. 661-667.
- Five Schott Glass Types, Melles Griot, [en ligne],
http://www.mellesgriot.com/pdf/CatalogX/X_04_8-10.pdf, Consultation: 2008/05/14
- FLEMING, J. R., KEMKES, D., CHATTEN, R. G., CRESHAW, L. E. et IMBALZANO, J. F., *Materials of Construction for Pharmaceutical and Biotechnology Processing: Moving into the 21st Century*, DuPont, [en ligne],
http://www2.dupont.com/Teflon_Industrial/en_US/assets/downloads/h88813.pdf,
 Consultation: 2008/05/14
- GILCHRIST, K. H., BARKER, V. N., FLETCHER, L. E., DEBUSSCHERE, B. D., GHANOUNI, P., GIOVANGRANDI, L. et KOVACS, G. T. A. (2001). "General purpose, field-portable cell-based biosensor platform", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 16, n° 7-8, p. 557-564.
- GIULIANO, K. A., HASKINS, J. R. et TAYLOR, D. L. (2003). "Advances in high content screening for drug discovery", *Assay and Drug Development Technologies*, vol. 1, n° 4, p. 565-577.

GREEN, R. J., FRAZIER, R. A., SHAKESHEFF, K. M., DAVIES, M. C., ROBERTS, C. J. et TENDLER, S. J. B. (2000). "Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials", *Biomaterials*, vol. 21, n° 18, p. 1823-1835.

Guide for authors, Biosensors and Bioelectronics, [en ligne],
http://www.elsevier.com/framework_products/promis_misc/gfabiosmarch2007.pdf,
Consultation: 2008/05/06

HANSSON, K. M., JOHANSEN, K., WETTERO, J., KLENKAR, G., BENESCH, J., LUNDSTROM, I., LINDAHL, T. L. et TENGVALL, P. (2007). "Surface plasmon resonance detection of blood coagulation and platelet adhesion under venous and arterial shear conditions", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, n° 2, p. 261-268.

HECHT, E. (2002). *Optics*, Reading, Massachusetts, 4th Edition, Addison Wesley, 698 p.

HEUMANN, D. et ROGER, T. (2002). "Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria", *Clinica Chimica Acta*, vol. 323, n° 1-2, p. 59-72.

HIDE, M., TSUTSUI, T., SATO, H., NISHIMURA, T., MORIMOTO, K., YAMAMOTO, S. et YOSHIKATO, K. (2002). "Real-Time Analysis of Ligand-Induced Cell Surface and Intracellular Reactions of Living Mast Cells Using a Surface Plasmon Resonance-Based Biosensor", *Analytical Biochemistry*, vol. 302, n° 1, p. 28-37.

HOMOLA, J. (1997). "On the sensitivity of surface plasmon resonance sensors with spectral interrogation", *Sensors and Actuators B (Chemical)*, vol. 41, n° 1-3, p. 207-211.

HOMOLA, J. (2003). "Present and future of surface plasmon resonance biosensors", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 377, n° 3, p. 528-539.

HOMOLA, J. (2006). *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Berlin, Springer, 251 p.

HOMOLA, J., KOUDELA, I. et YEE, S. S. (1999a). "Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison", *Sensors and Actuators B (Chemical)*, vol. 54, n° 1-2, p. 16-24.

HOMOLA, J., YEE, S. S. et GAUGLITZ, G. (1999b). "Surface plasmon resonance sensors: review", *Sensors and Actuators B (Chemical)*, vol. 54, n° 1-2, p. 3-15.

ISHIKAWA, T., ZHU, B.-L. et MAEDA, H. (2006). "Effect of sodium azide on the metabolic activity of cultured fetal cells." *Toxicology and Industrial Health*, vol. 22, n° 8, p. 337-341.

KANO, H. et KAWATA, S. (1995). "Grating-Coupled Surface-Plasmon for Measuring the Refractive-Index of a Liquid Sample", *Japanese Journal Of Applied Physics Part 1- Regular Papers Short Notes & Review Papers*, vol. 34, n° 1, p. 331-335.

- KEESE, C. R. et GIAEVER, I. (1994). "A Biosensor That Monitors Cell Morphology with Electrical Fields", *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, vol. 13, n° 3, p. 402-408.
- KOMAROVA, Y. A., MEHTA, D. et MALIK, A. B. (2007). "Dual regulation of endothelial junctional permeability", *Science's Signal Transduction Knowledge Environment*, vol. 2007, n° 412, p. re8.
- KRETSCHMANN, E. (1978). "The ATR method with focused light-application to guided waves on a grating", *Optics Communications*, vol. 26, n° 1, p. 41-44.
- KRISHNAN, R. V., VARMA, R. et MAYOR, S. (2001). "Fluorescence methods to probe nanometer-scale organization of molecules in living cell membranes", *Journal of fluorescence*, vol. 11, n° 3, p. 211-226.
- LAGARIAS, J. C., REEDS, J. A., WRIGHT, M. H. et WRIGHT, P. E. (1998). "Convergence properties of the Nelder-Mead simplex method in low dimensions", *SIAM Journal on Optimization*, vol. 9, n° 1, p. 112-147.
- LAZCKA, O., DEL CAMPO, F. J. et MUNOZ, F. X. (2007). "Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, n° 7, p. 1205-1217.
- LEARY, S. C., HILL, B. C., LYONS, C. N., CARLSON, C. G., MICHAUD, D., KRAFT, C. S., KO, K., GLERUM, D. M. et MOYES, C. D. (2002). "Chronic treatment with azide in situ leads to an irreversible loss of cytochrome c oxidase activity via holoenzyme dissociation", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n° 13, p. 11321-11328.
- LIEDBERG, B., NYLANDER, C. et LUNDSTROM, I. (1983). "Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing", *Sensors and Actuators*, vol. 4, n° 2, p. 299-304.
- LIEDBERG, B., NYLANDER, C. et LUNDSTROM, I. (1995). "Biosensing with Surface-Plasmon Resonance - How It All Started", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 10, n° 8, p. R1-R9.
- LIRTSMAN, V., ZIBLAT, R., GOLOSOVSKY, M., DAVIDOV, D., POGREB, R., SACKS-GRANEK, V. et RISHPON, J. (2005). "Surface-plasmon resonance with infrared excitation: Studies of phospholipid membrane growth", *Journal of Applied Physics*, vol. 98, n° 9.
- LIU, D., ZHANG, D., SCAFIDI, J., WU, X., CRAMER, C. C. et DAVIS, A. E., 3RD (2005). "C1 inhibitor prevents Gram-negative bacterial lipopolysaccharide-induced vascular permeability", *Blood*, vol. 105, n° 6, p. 2350-2355.
- MAALOUF, R., FOURNIER-WIRTH, C., COSTE, J., CHEBIB, H., SAIKALI, Y., VITTORI, O., ERRACHID, A., CLOAREC, J.-P., MARTELET, C. et JAFFREZIC-

- RENAULT, N. (2007). "Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: Comparison to surface plasmon resonance", *Analytical Chemistry*, vol. 79, n° 13, p. 4879-4886.
- MALHOTRA, B. D. et CHAUBEY, A. (2003) "Biosensors for clinical diagnostics industry", *Ninth International Meeting on Chemical Sensors. IMCS-9, 7-10 July 2002, Sensors and Actuators B (Chemical)*. Boston, MA, USA, Elsevier, p. 117-127
- MELLENDEZ, J., CARR, R., BARTHOLOMEW, D., TANEJA, H., YEE, S., JUNG, C. et FURLONG, C. (1997). "Development of a surface plasmon resonance sensor for commercial applications", *Sensors and Actuators B (Chemical)*, vol. 39, n° 1-3, p. 375-379.
- MULLETT, W. M., LAI, E. P. C. et YEUNG, J. M. (2000). "Surface plasmon resonance-based immunoassays", *Methods*, vol. 22, n° 1, p. 77-91.
- NELSON, S. G., JOHNSTON, K. S. et YEE, S. S. (1996). "High sensitivity surface plasmon resonance sensor based on phase detection", *Sensors and Actuators B (Chemical)*, vol. 35, n° 1-3, p. 187-191.
- NENNINGER, G. G., PILIARIK, M. et HOMOLA, J. (2002). "Data analysis for optical sensors based on spectroscopy of surface plasmons", *Measurement Science & Technology*, vol. 13, n° 12, p. 2038-2046.
- NIKITIN, P. I., BELOGLAZOV, A. A., KOCHERGIN, V. E., VALEIKO, M. V. et KSENEVICH, T. I. (1999). "Surface plasmon resonance interferometry for biological and chemical sensing", *Sensors and Actuators B (Chemical)*, vol. 54, n° 1-2, p. 43-50.
- NOBE, K., SONE, T., PAUL, R. J. et HONDA, K. (2005). "Thrombin-induced force development in vascular endothelial cells: contribution to alteration of permeability mediated by calcium-dependent and -independent pathways", *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 99, n° 3, p. 252-263.
- NYLANDER, C., LIEBERG, B. et LIND, T. (1982). "Gas detection by means of surface plasmon resonance", *Sensors and Actuators*, vol. 3, n°, p. 79-88.
- ONG, B. H., YUAN, X. C., TJIN, S. C., ZHANG, J. W. et NG, H. M. (2006). "Optimised film thickness for maximum evanescent field enhancement of a bimetallic film surface plasmon resonance biosensor", *Sensors and Actuators B (Chemical)*, vol. 114, n° 2, p. 1028-1034.
- PANCRAZIO, J. J., WHELAN, J. P., BORKHOLDER, D. A., MA, W. et STENGER, D. A. (1999). "Development and application of cell-based biosensors", *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 27, n° 6, p. 697-711.

- PHILLIPS, K. S., HAN, J. H., MARTINEZ, M., WANG, Z. Z., CARTER, D. et CHENG, Q. (2006). "Nanoscale glassification of gold substrates for surface plasmon resonance analysis of protein toxins with supported lipid membranes", *Analytical Chemistry*, vol. 78, n° 2, p. 596-603.
- PRESS, W. H., TEUKOLSKY, S. A., VETTERLING, W. T. et FLANNERY, B. P. (1992). *Numerical Recipes in C*, Cambridge, Second, Press Syndicate of the University of Cambridge, 994 p.
- RAETHER, H. (1988). *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*, Berlin, Springer-Verlag, 133 p.
- RAETZ, C. R. et WHITFIELD, C. (2002). "Lipopolysaccharide endotoxins", *Annual review of biochemistry*, vol. 71, n°, p. 635-700.
- RANG, H. P., DALE, M. M. et RITTER, J. M. (1999). *Pharmacology*, (s.l.), Fourth, Churchill Livingstone, 830 p.
- SCHNEIDER, M., MOHWALD, H. et AKARI, S. (2003). "Quantitative measurement of chromium's ability to promote adhesion", *The Journal of Adhesion*, vol. 79, n° 6, p. 597-607.
- SCHREIBER, F. (2000). "Structure and growth of self-assembling monolayers", *Progress in Surface Science*, vol. 65, n° 5-8, p. 151-256.
- SCHUCK, P. (1997). "Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules", *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure*, vol. 26, n°, p. 541-566.
- SHUMAKER-PARRY, J. S. et CAMPBELL, C. T. (2004). "Quantitative methods for spatially resolved adsorption/desorption measurements in real time by surface plasmon resonance microscopy", *Analytical Chemistry*, vol. 76, n° 4, p. 907-917.
- TENCZA, S. B. et SIPE, M. A. (2004). "Detection and classification of threat agents via high-content assays of mammalian cells", *Journal of Applied Toxicology*, vol. 24, n° 5, p. 371-377.
- THIRSTRUP, C. et ZONG, W. (2005). "Data analysis for surface plasmon resonance sensors using dynamic baseline algorithm", *Sensors and Actuators B (Chemical)*, vol. 106, n° 2, p. 796-802.
- TOBISKA, P. et HOMOLA, J. (2005). "Advanced data processing for SPR biosensors", *Sensors and Actuators B (Chemical)*, vol. 107, n° 1, p. 162-169.
- TONG, C. W., KOLOMENSKII, A., LIOUBIMOV, V. A., SCHUESSLER, H. A., TRACHE, A., GRANGER, H. J. et MUTHUCHAMY, M. (2001). "Measurements of the cross-

- bridge attachment/detachment process within intact sarcomeres by surface plasmon resonance", *Biochemistry*, vol. 40, n° 46, p. 13915-13924.
- VO-DINH, T., KASILI, P. et WABUYELE, M. (2006). "Nanoprobes and nanobiosensors for monitoring and imaging individual living cells", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 2, n° 1, p. 22-30.
- WIECZERZAK, E., HAMEL, R., JR., CHABOT, V., AIMEZ, V., GRANDBOIS, M., CHARETTE, P. G. et ESCHER, E. (2008). "Monitoring of native chemical ligation on solid substrate by surface plasmon resonance", *Biopolymers*, vol. 90, n° 3, p. 415-420.
- WOOD, R. W. (1902). "On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum", *Proceedings of the Physical Society of London*, vol., n° 1, p. 269.
- XU, G. X., YE, X. S., QIN, L. F., XU, Y., LI, Y., LI, R. et WANG, P. (2005). "Cell-based biosensors based on light-addressable potentiometric sensors for single cell monitoring", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, n° 9, p. 1757-1763.
- YANASE, Y., SUZUKI, H., TSUTSUI, T., HIRAGUN, T., KAMEYOSHI, Y. et HIDE, M. (2007). "The SPR signal in living cells reflects changes other than the area of adhesion and the formation of cell constructions", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, n° 6, p. 1081-1086.
- YOTTER, R. A., LEE, L. A. et WILSON, D. M. (2004a). "Sensor technologies for monitoring metabolic activity in single cells - Part I: Optical methods", *IEEE Sensors Journal*, vol. 4, n° 4, p. 395-411.
- YOTTER, R. A. et WILSON, D. M. (2004b). "Sensor technologies for monitoring metabolic activity in single cells - Part II: Nonoptical methods and applications", *IEEE Sensors Journal*, vol. 4, n° 4, p. 412-429.
- YU, X. L., WANG, D. X. et YAN, Z. B. (2003). "Simulation and analysis of surface plasmon resonance biosensor based on phase detection", *Sensors and Actuators B (Chemical)*, vol. 91, n° 1-3, p. 285-290.
- YU, X. L., ZHAO, L. Q., JIANG, H., WANG, H. J., YIN, C. Y. et ZHU, S. G. (2001). "Immunosensor based on optical heterodyne phase detection", *Sensors and Actuators B (Chemical)*, vol. 76, n° 1-3, p. 199-202.
- YUAN, X.-C., ONG, B. H., TAN, Y. G., ZHANG, D. W., IRAWAN, R. et TJIN, S. C. (2006). "Sensitivity-stability-optimized surface plasmon resonance sensing with double metal layers", *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, vol. 8, n° 11, p. 959-963.

ZAYATS, A. V. et SMOLYANINOV, I. I. (2003). "Near-field photonics: surface plasmon polaritons and localized surface plasmons", *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, vol. 5, n° 4, p. 16-50.

ZIBLAT, R., LIRTSMAN, V., DAVIDOV, D. et AROETI, B. (2006). "Infrared surface plasmon resonance: A novel tool for real time sensing of variations in living cells", *Biophysical Journal*, vol. 90, n° 7, p. 2592-2599.